

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München



cGMP-abhängige Proteinkinase I und Eisenstoffwechsel

Elisabeth Angermeier
aus München

2015

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. Franz Hofmann betreut und von Herrn Prof. Dr. Martin Biel von der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, 10.12.2015

(Elisabeth Angermeier)

Dissertation eingereicht am	10.12.2015
1. Gutachter	Herr Prof. Dr. Franz Hofmann
2. Gutachter	Herr Prof. Dr. Martin Biel
Mündliche Prüfung am	22.02.2016

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Abbildungsverzeichnis.....	4
Abkürzungen	5
1. Einleitung	8
1.1. Der NO-cGMP-Signalweg.....	8
1.2. cGMP-abhängige Proteinkinasen	10
1.2.1. Struktur	10
1.2.2. Expressionsmuster	11
1.2.3. Funktionen der cGKI.....	12
1.2.3.1. Kontraktion und cGKI-vermittelte Relaxation der glatten Muskulatur.....	12
1.2.3.2. Die Rolle der cGKI in der duodenalen Bikarbonatsekretion.....	15
1.2.4. cGKI-Knockout- und cGKI-Rescue-Mäuse	15
1.3. Der Eisenstoffwechsel	16
1.3.1. Eisenverteilung im menschlichen Körper	16
1.3.2. Eisenabsorption	17
1.3.3. Transport und zelluläre Aufnahme	19
1.3.4. Speicherung.....	20
1.3.5. Recycling.....	20
1.3.6. Hepcidin – Regulator der systemischen Eisenhomöostase	21
1.3.7. Zelluläre Regulation der Eisenhomöostase durch IRPs	23
1.3.8. Eisenerkrankungen.....	24
1.4. Ziele der Arbeit	26
2. Material und Methoden	27
2.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	27
2.2. Geräte	28
2.3. Verwendete Mauslinien	29
2.4. Versuchstierhaltung	29
2.5. Genotypisierung der experimentell verwendeten Mäuse	30

Inhaltsverzeichnis

2.5.1. Isolierung genomischer DNA aus Mausgewebe	30
2.5.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	30
2.5.3. Agarose-Gelelektrophorese	32
2.6. Proteingewinnung und -analyse.....	33
2.6.1. Proteingewinnung aus murinem Gewebe	33
2.6.2. Quantitative Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure-Test	34
2.6.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	34
2.6.4. Western Blot	36
2.7. RNA-Gewinnung und -Analyse	38
2.7.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus Mausgewebe	38
2.7.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	39
2.7.3. DNA-Verdau	39
2.7.4. Reverse Transkription	39
2.7.5. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)	40
2.8. Histologische Untersuchungen.....	41
2.8.1. Anfertigen von Paraffinschnitten.....	41
2.8.2. Berliner Blau-Färbung	42
2.9. Eiseninjektionen	42
2.10. Blutentnahme und Blutwertbestimmungen	43
2.11. Eisenmessung	43
2.12. Interleukin-6 (IL-6) ELISA	44
2.13. Isolation der TER-119-positiver Zellen	45
2.14. Haemocult®-Test.....	46
2.15. Statistische Auswertung	47
3. Ergebnisse	48
3.1. Einfluss von Protonenpumpenhemmern (PPIs) auf die Lebensdauer cGKI-defizienter Mäuse	48
3.2. Beeinflussung der intestinalen Blutung durch PPIs	49
3.3. Untersuchung der Blutwerte.....	50
3.3.1. Einfluss von Eiseninjektionen auf das Blutbild.....	52
3.3.2. Einfluss von PPI-Gabe auf das Blutbild	53
3.4. Splenomegalie	54

Inhaltsverzeichnis

3.5. Eisenspeicher	56
3.5.1. Ferritin-Menge in der Leber und Milz	57
3.5.2. Histologische Untersuchungen	59
3.5.3. Plasma-Eisenkonzentration.....	60
3.6. Das HAMP-mRNA-Level in der Leber	61
3.7. Das Transferrin-Rezeptor 1-mRNA-Level in der Leber	63
3.8. Die Interleukin-6-Konzentration im Blut	64
3.9. Die Expression der cGKI in Erythrozyten	65
4. Diskussion	68
4.1. Folgen der Behandlung mit PPIs.....	68
4.2. Erörterung weiterer möglicher Ursachen für die Anämie	71
5. Zusammenfassung	74
6. Literaturverzeichnis	75
7. Anhang	80
7.1. Verwendete Primer	80
7.1.1. Primer für Genotypisierung	80
7.1.2. Primer für qRT-PCR	80
7.2. Verwendete Antikörper.....	81
8. Eigene Publikationen	82

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der NO/cGMP-Signalweg.....	9
Abbildung 2: Struktur der cGKs.	11
Abbildung 3: Die Kontraktion und cGKI-abhängige Relaxation in der glatten Muskelzelle.....	14
Abbildung 4: Eisenverteilung und -austausch im menschlichen Körper.....	18
Abbildung 5: Die Regulierung des systemischen Eisenstoffwechsels.	22
Abbildung 6: Die Regulierung der zellulären Eisenhomöostase.	24
Abbildung 7: Kaplan-Meier-Überlebenskurve.	49
Abbildung 8: Intestinale Blutung.....	50
Abbildung 9: Blutparameter.....	52
Abbildung 10: Einfluss von Eiseninjektionen auf die Blutparameter.....	53
Abbildung 11: Einfluss von PPI auf die Blutparameter.	54
Abbildung 12: Milzgewicht im Verhältnis zum Gesamtgewicht.	55
Abbildung 13: Milzgewicht im Verhältnis zum Gesamtgewicht in Abhängigkeit vom Alter. ..	56
Abbildung 14: Ferritin-leichte-Kette (FLC) in der Leber.	57
Abbildung 15: Ferritin-leichte-Kette (FLC) in der Milz.	58
Abbildung 16: Berliner Blau-Färbung von Milzgewebeschnitten.	60
Abbildung 17: Gesamteisengehalt im Plasma.....	61
Abbildung 18: Quantitative real-time PCR der relativen Leber-HAMP-mRNA.	62
Abbildung 19: Relatives TFR1-mRNA-Level in der Leber.	64
Abbildung 20: Serum-Interleukin-6-Konzentration.	65
Abbildung 21: Expression der cGKI in Erythrozyten.....	67

Abkürzungen

Abkürzungen

β -Res.	cGKI β -Rescue-Maus (exprimiert die cGKI β nur im glatten Muskel)
μ	Mikro-(10^{-6})
Abb.	Abbildung
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ANP	atriales natriuretisches Peptid
ANOVA	„analysis of variance“
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
Bp	Basenpaare
BK _{Ca} -Kanal	„large conductance Ca ²⁺ -activated K ⁺ -channel“
BMP	„Bone morphogenetic protein“
BNP	„Brain Natriuretic Peptide“
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calcium
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Calcium-Konzentration
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGKI (α/β)	cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I (α - oder β -Isoform)
cGKI	cGMP-abhängige Proteinkinase Typ II
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
Cm	Zentimeter
CNG-Kanal	zyklischer Nukleotid-gesteuerter Kationenkanal
CNP	C-Typ-natriuretisches Peptid
Ct	„cycle threshold“
D	Dezi-(10^{-1})
DAG	Diacylglycerol
Dcytb	„Duodenal cytochrome B“ – Ferrireduktase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMT1	divalenter Metallionen-Transporter 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
eNOS	endotheliale NOS
EtOH	Ethanol
Fe ²⁺ /Fe ³⁺	Eisen

Abkürzungen

FBXL5	„F-Box And Leucine-Rich Repeat Protein 5“
FLC	Ferritin-leichte-Kette
FHC	Ferritin-schwere-Kette
G	Gravitationskonstante oder Gramm
GPCR(z.B. G _{q/11} , G _{12/13})	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GMP	Guanosin-5'-monophosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
Hb α	Hämoglobin α
HCO ₃ ⁻	Bikarbonat
HCP1	Häm Carrier Protein 1
HFE	„High Iron Fe“ - hereditäre-Hämochromatose-Gen
H ₂ O _{bidest}	bidestilliertes Wasser
HO1	Hämoxygenase 1
I.E.	Internationale Einheit
IL-6	Interleukin-6
Inj.	Injektion
iNOS	induzierbare NOS
IP ₃	Inositol-1,4,5,-triphosphat
IPRI	IP ₃ -Rezeptor Typ I
IRAG	IP ₃ -Rezeptor-assoziiertes cGMP-Kinase-Substrat
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
L	Liter
M	Milli-(10 ⁻³) oder Meter
M	Molar, mol/Liter
MCV	mittleres zelluläres Erythrozyten-Volumen
min	Minute
Mol	Stoffmenge
MLCK	Myosin-Leichtkettenkinase
MLCP	Myosin-Leichtketten-Phosphatase
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MUPS®	„multiple-unit pellet systems“
MW	Mittelwert
MYPT1	„myosin phosphatase target subunit 1“
N	Nano-(10 ⁻⁹)
NaCl	Kochsalzlösung
nNOS	neuronale NOS
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase

Abkürzungen

OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
pGC	partikuläre Guanylylcyclase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
PPI	Protonenpumpenhemmer
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative real-time-PCR
RDW	Erythrozytenverteilungsbreite
RGS	„Regulator of G-Protein Signaling“
RhoA	„Ras homolog gene family member A“
RLC	regulatorischen Myosin-Leichtkette
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
ROCK	Rho-Kinase
ROX	Referenzfarbstoff
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sec	Sekunde
SEM	Standardabweichung des Mittelwerts
sGC	lösliche Guanylylcyclase
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS(T)	Tris-Borat-NaCl-(Tween)-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tf-(Fe ³⁺) ₂	Transferrin-gebundenes Eisen
TfR1 oder TfR2	Transferrin-Rezeptor 1 oder 2
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	„Unit“
UTR	nicht-translatierter Bereich
UV	Ultraviolett
V	Volt
W	Watt
WT	Wildtyp

1. Einleitung

Weltweit leiden circa 1,62 Milliarden Menschen an einer Anämie, was 24,8 % der Bevölkerung entspricht. Dabei sind sowohl die Bewohner armer als auch reicher Länder betroffen. Frauen in der Schwangerschaft und Kleinkinder haben ein größeres Risiko eine verminderte Hämoglobin-Konzentration im Blut aufzuweisen. Der primäre Grund für die Erkrankung ist Eisenmangel, aber auch zahlreiche andere Bedingungen können zu einer Anämie führen (McLean et al., 2009). Der NO-cGMP-cGKI-Signalweg scheint den Blut- bzw. Eisenstoffwechsel ebenfalls zu beeinflussen, da Mäuse, die keine cGMP-abhängige Proteinkinase I exprimieren, eine Anämie entwickeln (Foller et al., 2008).

1.1. Der NO-cGMP-Signalweg

Stickstoffmonoxid (NO) wird durch die katalytische Aktivität der NO-Synthasen (NOS) aus der Aminosäure L-Arginin gebildet (Ignarro et al., 1999).

Bislang sind drei NOS-Isoformen bekannt: die induzierbare NOS (iNOS), die neuronale NOS (nNOS) und die endotheliale NOS (eNOS). Die nNOS und die eNOS werden konstitutiv exprimiert und ihre Aktivität durch die freie intrazelluläre Calcium-Konzentration reguliert. Die iNOS ist hingegen Calcium-unabhängig und auf transkriptioneller Ebene induzierbar. Sie wird meist als Antwort auf inflammatorische Stimuli in Makrophagen und Neutrophilen exprimiert. Die Namen der nNOS und der eNOS basieren auf den Geweben, in denen sie initial entdeckt wurden, wobei sich ihre Lokalisation nicht nur auf Nervenzellen (nNOS) und Endothelzellen (eNOS) beschränkt (Forstermann et al., 1991).

Der gasförmige Botenstoff NO kann frei durch die Zellmembran diffundieren und somit leicht in benachbarte Zellen gelangen. In der Zielzelle angekommen, wirkt NO über viele verschiedene – auch cGMP-unabhängige – Wege (Hanafy et al., 2001). Das wohl bedeutendste Ziel des Botenstoffes ist die lösliche Guanylylcyclase (sGC), ein Heterodimer aus einer α - und einer Häm-bindenden β -Untereinheit. Durch die Bindung von NO an die prosthetische Hämgruppe wird das Enzym um das bis zu 200-fache aktiviert, sodass es die Synthese von zyklischem Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) aus Guanosin-5'-triphosphat (GTP) katalysiert. Neben der im Zytosol vorliegenden sGC kann der zelluläre cGMP-Spiegel auch durch die partikuläre Guanylylcyclase (pGC) erhöht werden, deren Aktivierung über

natriuretische Peptide (ANP, BNP, CNP) oder (Uro-)Guanylin erfolgt (Friebe and Koesling, 2003; Kuhn, 2003).

Das gebildete cGMP beeinflusst folgende – bisher bekannte – Zielstrukturen (siehe Abb. 1):

- zyklische Nukleotid-gesteuerte Kationenkanäle (CNG-Kanäle),
- Phosphodiesterasen (PDE) und
- cGMP-abhängige Proteinkinasen (cGKs) (Hofmann et al., 2000).

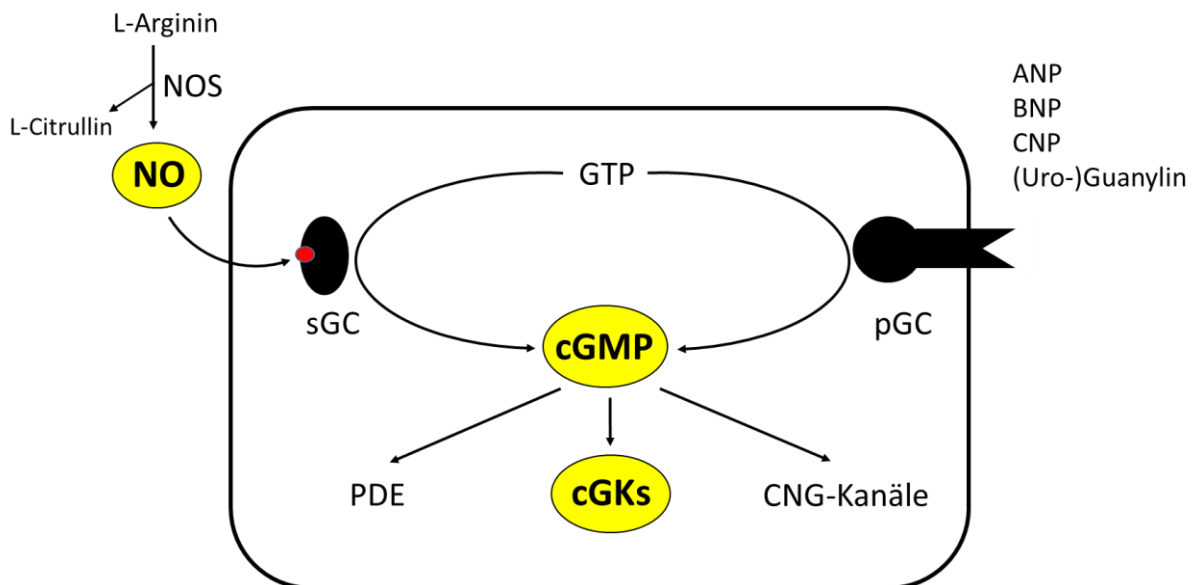


Abbildung 1: Der NO/cGMP-Signalweg.

NO-Synthasen (NOS) katalysieren die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) aus L-Arginin. NO diffundiert durch die Zellmembran und aktiviert die lösliche Guanylylcyclase (sGC), welche die Bildung von cGMP aus GTP katalysiert. Die Synthese von cGMP kann zudem durch die Aktivierung der partikulären Guanylylcyclase mit Hilfe natriuretischer Peptide (ANP, BNP, CNP) oder (Uro-)Guanylin erfolgen. Zielproteine von cGMP sind Phosphodiesterasen (PDE), cGMP-abhängige Proteinkinasen (cGKs) und zyklische Nukleotid-gesteuerte Kationenkanäle (CNG-Kanäle).

Die cGMP-bedingte Öffnung von CNG-Kanälen spielt eine wichtige Rolle bei der Signalweiterleitung von visuellen und olfaktorischen Neuronen (Biel et al., 1998).

Bei den Phosphodiesterasen handelt es sich um 11 Enzym-Familien (PDE1-11), welche die Hydrolyse von cGMP und cAMP zu Guanosin-5'-monophosphat (GMP) bzw. Adenosin-5'-monophosphat (AMP) katalysieren und somit die intrazelluläre cGMP- bzw. cAMP-Konzentration vermindern. Zudem kann cGMP die Konzentration von cAMP beeinflussen, indem es cAMP-spezifische PDE stimuliert (PDE2) oder inhibiert (PDE3) (sog. „cross-talk“).

Die wohl pharmakologisch bedeutendste Phosphodiesterase ist die im glatten Muskel exprimierte PDE5, deren Inhibitoren bei erektiler Dysfunktion und pulmonaler arterieller

Hypertonie eingesetzt werden können (Bender and Beavo, 2006; Sonnenburg and Beavo, 1994).

Die dritte cGMP-Effektorklasse, die cGMP-abhängigen Proteinkinasen, werden im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

1.2. cGMP-abhängige Proteinkinasen

Proteinkinasen sind Enzyme, welche die Übertragung einer Phosphatgruppe des Donor-Moleküls Adenosintriphosphat (ATP) auf die Seitenketten-Hydroxylgruppe einer Aminosäure katalysieren. Die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (cGKs), welche die Haupteffektor-Proteine für cGMP darstellen, zählen zu den Serin/Threonin-Kinasen, d.h. die Aminosäuren Serin oder Threonin fungieren als Akzeptoren der Phosphatgruppe. In Säugetieren wurden zwei für cGKs kodierende Gene (*prkg1* und *prkg2*) identifiziert. *prkg1* kodiert für die im zellulären Zytoplasma vorliegende cGK Typ I (cGKI), welche durch alternatives Spleißen in zwei Isoformen exprimiert wird (cGKI α und cGKI β). Das für die membranständige cGK Typ II (cGKII) kodierende Gen ist *prkg2* (Hofmann, 2005; Pfeifer et al., 1999).

1.2.1. Struktur

Die cGKs lassen sich in drei funktionale Domänen einteilen (siehe Abb. 2):

- 1) Die N-terminale Domäne ermöglicht mittels der Leucin-Zipper-Region die Homodimerisierung identischer cGK-Monomere. Zudem vermittelt der Aminoterminus die Zielsteuerung der Kinasen zu verschiedenen subzellulären Strukturen. In Abwesenheit von cGMP wird die cGK-Aktivität durch den NH₂-Terminus unterdrückt, indem dieser das aktive Zentrum des Enzyms inhibiert (Pseudosubstratbindung). Die cGKs unterscheiden sich strukturell lediglich hinsichtlich ihrer N-terminalen Domänen.
- 2) Die regulatorische Domäne besteht aus einer hoch- und einer niedrig-affinen cGMP-Bindungsstelle. Eine Besetzung beider Bindungsstellen führt zu einer Konformationsänderung, worauf die inhibierende Wirkung des N-Terminus auf das katalytische Zentrum aufgehoben wird und damit eine enzymatische Phosphorylierung des Zielproteins möglich ist.
- 3) Die C-terminale katalytische Domäne enthält die ATP- und die Substratbindungsstelle und

Einleitung

katalysiert den Phosphattransfer von ATP auf ein Serin oder Threonin des Substrates (Hofmann, 2005; Pfeifer et al., 1999).

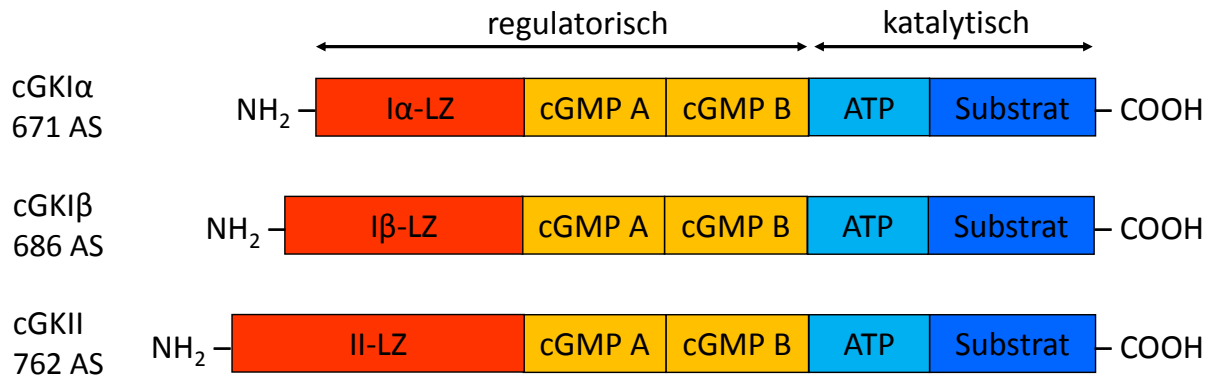


Abbildung 2: Struktur der cGKs.

Die cGKs bestehen aus einer aminoterminalen Domäne, einer regulatorischen Untereinheit mit Leucin-Zipper-Motiv (LZ) und zwei cGMP-Bindungstaschen (cGMP A, cGMP B) und einer C-terminalen katalytischen Untereinheit mit der ATP- und der Substratbindungsstelle. Die cGKIα und cGKIβ sowie die cGKII differieren in ihrem aminoterminalen Abschnitt (modifiziert nach (Pfeifer et al., 1999)).

1.2.2. Expressionsmuster

Die cGMP-abhängigen Proteinkinasen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Gewebeverteilung und dementsprechend auch hinsichtlich ihrer Funktionen.

Die cGKII wird in Chondrozyten, in den juxtaglomerulären Zellen der Niere, der intestinalen Mukosa, der Zona Glomerulosa der Nebenniere, in der Lunge und im Gehirn exprimiert (El-Husseini et al., 1999; Gambaryan et al., 2003; Gambaryan et al., 1996; Hofmann et al., 2006; Lohmann et al., 1997; Markert et al., 1995).

Wichtige Funktionen der cGKII sind die Hemmung der renalen Renin-Sekretion, die Stimulation der Chlorid- und Wasser-Sekretion im Darm, die Beeinflussung des Knochenwachstums sowie des circadianen Rhythmus (Oster et al., 2003; Pfeifer et al., 1996; Vaandrager et al., 1998; Wagner et al., 1998).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit steht die cGKI - die dominierende Isoform im kardiovaskulären System - im Vordergrund. Sie ist in großen Mengen in vaskulären und nicht-vaskulären Glattmuskelzellen (Geiselhoring et al., 2004; Keilbach et al., 1992), in Thrombozyten (Waldmann et al., 1986) und in der Niere (Joyce et al., 1986) vorhanden, außerdem im vaskulären Endothelium (Draijer et al., 1995), im Herz (Kumar and Lindner, 1997), in

Monozyten und Makrophagen (Pryzwansky et al., 1995) sowie in Neutrophilen (Werner et al., 2005) zu finden. Im Nervensystem ist die cGKI in Spinalganglien (Qian et al., 1996), der neuromuskulären Endplatte (Chao et al., 1997), in Purkinjezellen des Cerebellums (Lohmann et al., 1981) und im Hippocampus (Kleppisch et al., 1999) sowie weiteren Hirnregionen und der Retina (Feil et al., 2005) lokalisiert. Zudem konnte die cGKI in weißen und braunen Fettzellen detektiert werden (Haas et al., 2009; Leiss et al., 2014).

1.2.3. Funktionen der cGKI

Aufgrund der Expression in zahlreichen Geweben bzw. Zelltypen sind die Funktionen der cGKI sehr vielseitig, die zellulären Wirkmechanismen jedoch nur teilweise verstanden (Hofmann et al., 2006; Hofmann and Wegener, 2013). Im Folgenden sollen nur einige der Effekte des NO-cGMP-cGKI-Signalweges aufgeführt werden:

Die Verwendung eines Knockout-Mausmodells zeigte, dass die cGKI eine inhibierende Wirkung auf die Thrombozytenaggregation hat (Massberg et al., 1999) und der negativ inotrope Effekt von cGMP im isolierten Herzen der Maus cGKI-abhängig ist (Wegener et al., 2002). Im neuronalen Bereich beeinflusst die cGKI die synaptische Plastizität, das Schmerzempfinden, das Angstgedächtnis und spezielle Formen des motorischen Lernens, nämlich den vestibulookulären Reflex (Feil et al., 2003; Kleppisch et al., 2003; Luo et al., 2012; Paul et al., 2008). Zudem scheint die cGKI inhibierend auf das kardiale Remodelling zu wirken und den Energie- und Fettstoffwechsel zu beeinflussen (Hofmann and Wegener, 2013). Untersuchungen an cGKI-defizienten Mäusen ergaben, dass die cGMP-abhängige Proteinkinase I an der Kontrolle des vaskulären Tonus beteiligt ist und dadurch eine wichtige Rolle bei der Regulation des systemischen Blutdrucks spielt (Pfeifer et al., 1998).

1.2.3.1. Kontraktion und cGKI-vermittelte Relaxation der glatten Muskulatur

Der Tonus der glatten Muskulatur wird maßgeblich durch die intrazelluläre Calcium-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) und die Ca^{2+} -Sensitivität bestimmt:

Die Bindung eines Agonisten an seinen G-Protein-gekoppelten Rezeptor führt zur Aktivierung von $G_{q/11}$, wodurch wiederum die Phospholipase C β (PLC β) angeregt wird. PLC β katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$) zu Diacylglycerol (DAG) und

Einleitung

Inositol-1,4,5,-triphosphat (IP_3), welches nach Bindung an den IP_3 -Rezeptor Typ I ($IPRI$) die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern bewirkt.

Zudem führt die Depolarisation der Zellmembran zur Öffnung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen und einem damit verbundenen Einstrom von Ca^{2+} -Ionen. Die erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration vermittelt über die Aktivierung der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Myosin-Leichtkettenkinase (MLCK) die Phosphorylierung der regulatorischen Myosin-Leichtkette (RLC). Dies führt zur Aktivierung der Myosin-ATPase und schließlich zur Kontraktion der glatten Muskulatur. Bei einer Verringerung der $[Ca^{2+}]_i$ wird die regulatorische Myosin-Leichtkette durch die Myosin-Leichtketten-Phosphatase (MLCP) dephosphoryliert (Hofmann, 2005).

Die MLCP ist ein Holoenzym, das aus folgenden drei Untereinheiten besteht: einer 37 kDa katalytischen Untereinheit (PP1c), einer 20 kDa-Untereinheit unbekannter Funktion und einer 130 kDa großen regulatorischen Untereinheit (MYPT1) (Hartshorne et al., 1998).

Die Kontraktion der glatten Muskulatur kann zudem bei konstanter $[Ca^{2+}]_i$ erfolgen, indem mittels des RhoA/Rho-Kinase-Signalweges die Sensitivität des kontraktile Apparates für $[Ca^{2+}]_i$ verändert wird: Die Rho-Kinase (ROCK) hemmt nach der Aktivierung durch RhoA die MLCP, indem sie die regulatorische Untereinheit MYPT1 phosphoryliert. RLC liegt somit vermehrt im phosphorylierten Status vor (Somlyo and Somlyo, 2003).

In glatten Muskelzellen wird sowohl die cGKI α als auch die cGKI β exprimiert (Geiselhöringer et al., 2004; Keilbach et al., 1992). Die cGKI-abhängige Relaxation der glatten Muskulatur kann durch viele verschiedene Mechanismen erfolgen. Einige der Signalwege sind im Nachfolgenden beschrieben:

- Ein möglicher Wirkmechanismus der cGKI ist die Phosphorylierung des kleinen GTP-bindenden Proteins RhoA, welches durch $G\alpha_{12/13}$ aktiviert wird. Die Phosphorylierung von RhoA hat zur Folge, dass der GDP/GTP-Austausch des Proteins gestört wird und somit die Bindung an ROCK sowie dessen Aktivierung verhindert wird (Bonnevier and Arner, 2004; Sauzeau et al., 2000; Somlyo and Somlyo, 2003).
- Zudem kann die cGKI α die regulatorische Untereinheit MYPT1 der MLCP an Serin-695 phosphorylieren und damit die inhibierend wirkende Phosphorylierung von Threonin-696 durch verschiedene Kinasen (u.a. ROCK) verhindern (Surks and Mendelsohn, 2003; Surks et al., 2003).

Einleitung

- Ein weiteres Substrat der cGKI α ist RGS2, Regulator der G-Protein-Signalwirkung. cGKI α phosphoryliert RGS2 und unterbindet durch die Erhöhung der GTPase-Aktivität des Gq-Proteins die Signalübertragung Gq-gekoppelter Rezeptoren (Tang et al., 2003). RGS4 kann ebenfalls durch cGKI aktiviert werden (Huang et al., 2007).
- Die IP₃-Rezeptor-vermittelte Ca²⁺-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum kann durch die cGKI β -abhängige Phosphorylierung von IRAG (IP₃-Rezeptor-assoziiertes cGMP-Kinase-Substrat) inhibiert werden. cGKI β , IRAG und IP₃RI bilden hierbei einen stabilen trimeren Komplex (Schlossmann et al., 2000).
- Ein weiterer Mechanismus, der zur Senkung der [Ca²⁺]_i führt, ist die Aktivierung von BK_{Ca}-Kanälen (Ca²⁺-aktivierte Kaliumkanäle) durch cGKI. Der daraus resultierende Kaliumausstrom führt zur Hyperpolarisation der Zellmembran und schließlich zur Schließung spannungsabhängiger L-Typ Calciumkanäle (Alioua et al., 1998; Fukao et al., 1999).

Abb. 3 fasst die möglichen Reaktionsmechanismen der cGKI im glatten Muskel zusammen.

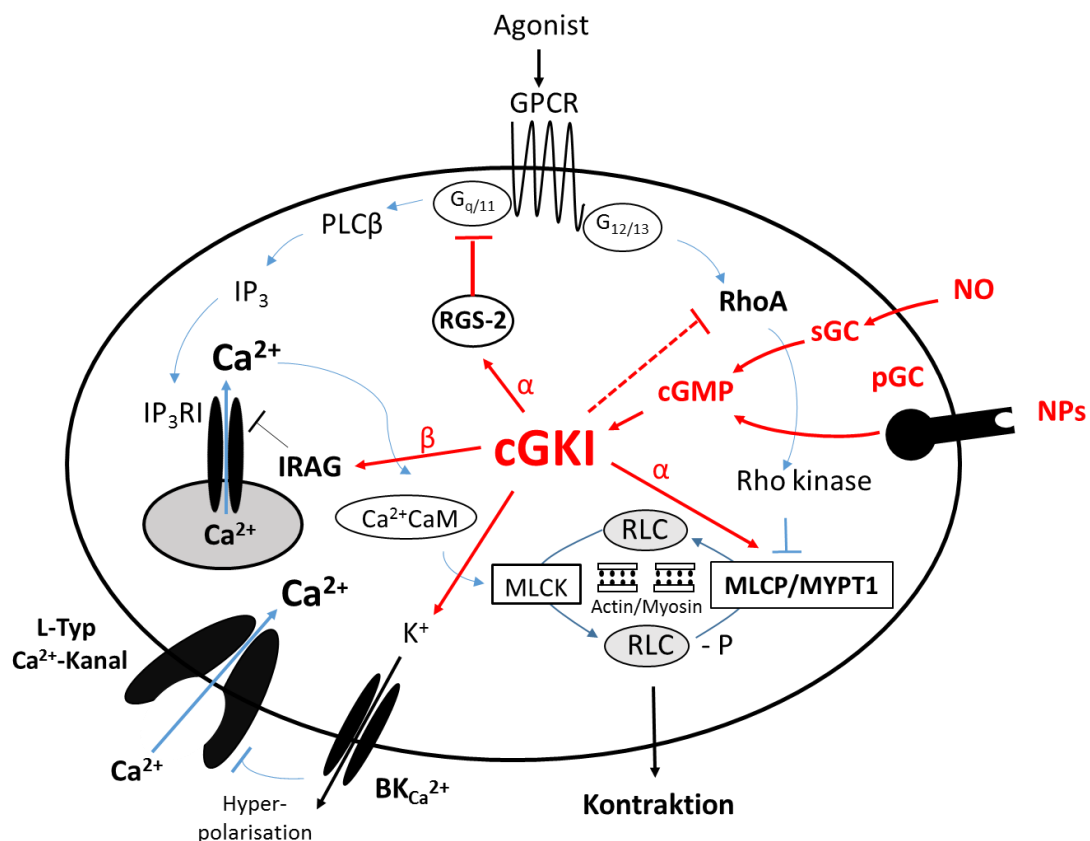


Abbildung 3: Die Kontraktion und cGKI-abhängige Relaxation in der glatten Muskelzelle.

Bei den blauen Linien handelt es sich um Mechanismen, welche die Kontraktion der glatten Muskelzelle induzieren. Die roten Striche sind Signalwege der cGKI, die durch *in vivo* Studien bestätigt wurden. Noch nicht im intakten Tiergewebe verifizierte Wege der cGKI sind in gestrichelten roten Linien dargestellt. Weitere Erklärungen sind im Text gegeben (nach (Hofmann et al., 2006)).

Alle gezeigten Relaxationsmechanismen der cGKI können in einer Zelle vorkommen, dabei jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt sein. So erfolgt die cGMP/cGKI-vermittelte Relaxation der glatten Muskelzellen des Colons mit und die des Jejunums ohne Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ (Frei et al., 2009).

1.2.3.2. Die Rolle der cGKI in der duodenalen Bikarbonatsekretion

Der Kontakt der duodenalen Mukosa mit der Magensäure führt zu einer lange anhaltenden Bikarbonat (HCO_3^-)-Sekretion, die zu den wichtigsten Schutzmechanismen des Duodenum zählt. cGKI-defiziente Mäuse und Mäuse, welche die cGKI ausschließlich im glatten Muskel exprimieren, entwickeln ein Ulcus im Duodenum. Es wurde gezeigt, dass die selektive Inaktivierung der cGKI in Neuronen die HCO_3^- -Sekretion im Duodenum stark reduziert. Die cGKI wurde im Hirnstamm im *Nucleus tractus solitarii* lokalisiert, welcher den afferenten mit dem efferenten *Nervus vagus* verbindet. Die Trunkierung des subdiaphragmatischen *Nervus vagus* verminderte die Protonen-induzierte Bikarbonatsekretion signifikant, wohingegen dessen Stimulation eine gleiche HCO_3^- -Sekretion bei cGKI-defizienten, neuronal-cGKI-defizienten Tieren und Kontrollmäusen zur Folge hatte. Dies lässt darauf schließen, dass das Fehlen der cGKI in Neuronen die cGKI-vermittelte Signaltransduktion vom afferenten auf den efferenten *Nervus vagus* stört und damit zu einer massiv verminderten Bikarbonatsekretion und schließlich zum Ulcus im Duodenum führt (Singh et al., 2012).

1.2.4. cGKI-Knockout- und cGKI-Rescue-Mäuse

Die Inaktivierung des für cGKI kodierenden Gens *prkg1* führt zu einem multiplen Phänotyp in Mäusen. So weisen die cGKI-Knockout (cGKI KO)-Mäuse eine starke Dehnung des Magens und des Darms, eine Hypertrophie des gastrischen Fundus und Pylorus sowie eine gestörte gastrointestinale Motilität auf. Das Fehlen der cGKI führt zudem zu einer Hemmung der NO/cGMP-abhängigen Relaxation der vaskulären glatten Muskulatur (Pfeifer et al., 1998). Die Fortpflanzungsfähigkeit männlicher cGKI KO-Tiere ist aufgrund von Erektionsstörungen stark eingeschränkt (Hedlund et al., 2000). Außerdem zeigen cGKI KO-Mäuse sowohl eine gestörte Thrombozytenaggregation als auch eine gestörte Entzündungsantwort (Massberg et al., 1999; Werner et al., 2005) und weisen eine Anämie auf (Foller et al., 2008).

Die Lebenserwartung der konventionellen cGKI KO-Mäuse ist stark reduziert, über 50 % der Tiere sterben innerhalb der ersten 5-6 Wochen. Da viele der multiplen Defekte auf die Rolle der cGKI in den glatten Muskelzellen zurückzuführen sind, wurde eine Mauslinie generiert, welche die cGKI ausschließlich in glatten Muskelzellen exprimiert. Diese sogenannten cGKI α - oder cGKI β -Rescue-Mäuse sind auf einem cGKI-defizienten Hintergrund gezüchtet, exprimieren die cGKI α oder I β jedoch unter Kontrolle des Glattnuskel-spezifischen SM22 α -Promotors. Die Lebensdauer dieser Tiere ist deutlich höher als jene der konventionellen cGKI KO-Mäuse (Weber et al., 2007).

1.3. Der Eisenstoffwechsel

Eisen, das zweithäufigste Element der Erde, ist für fast alle Organismen lebensnotwendig. Aufgrund seiner Fähigkeit als Elektronendonator und -akzeptor zu wirken, dient das Metall als Kofaktor für zahlreiche Eiweiße. Proteine können Eisen in Form prosthetischer Gruppen als Eisen-Schwefel-Cluster bzw. Häm oder durch direkte Bindung an Aminosäuren-Seitenketten enthalten. Eisen-haltige Proteine sind an vielen biologischen Mechanismen beteiligt. So regeln sie beispielsweise die Sauerstoffaufnahme und den -transport (Hämoglobin oder Myoglobin), katalysieren Redoxreaktionen (wie z.B. Cytochrome, Ribonukleotid-Reduktasen, NO-Synthasen, NADPH-Oxidasen, Myeloperoxidasen) und transportieren oder speichern Eisen (z.B. Transferrin, Ferritin). Eisen-haltige Proteine sind somit essentiell für den Energiestoffwechsel, die Nukleotid-Synthese, die Immunabwehr und verschiedene Signalwege (Ganz, 2013).

1.3.1. Eisenverteilung im Körper

Der Gesamtbestand des menschlichen Organismus an Eisen beträgt 3000-5000 mg. Davon sind etwa 2500 mg im Hämoglobin der zirkulierenden Erythrozyten und deren Vorläuferzellen im Knochenmark gebunden, circa 300 mg entfallen auf das Myoglobin der Muskeln. Die retikuloendothelialen Makrophagen in der Milz, Leber und im Knochenmark enthalten eine transiente Eisenfraktion von etwa 600 mg, während überschüssiges Eisen in Form von Ferritin und Hämosiderin vor allem in der Leber gespeichert wird. 3-4 mg Eisen sind im Plasma an das Transportprotein Transferrin gebunden, sonstige Eisen-haltige Proteine beinhalten in Summe

8 mg des Elements. Im Durchschnitt werden täglich 1-2 mg Eisen durch Abschilferung von Epithelzellen des Magen-Darm-Traktes oder der Haut verloren. Bei Frauen im reproduktiven Alter sind die Verluste aufgrund der monatlichen Menstruationsblutung höher als bei Männern. Ein aktiver Exkretionsmechanismus für Eisen ist nicht bekannt (Pantopoulos et al., 2012).

Der tägliche Verlust wird durch die intestinale Absorption von 1-2 mg Eisen ausgeglichen, was in etwa 10 % des Nahrungseisens entspricht. Die Eisenabsorption, die im Duodenum am stärksten ausgeprägt ist, kann bei chronischem Eisenmangel auf bis zu 5 mg pro Tag gesteigert werden (Nielsen, 2013).

Der Großteil des Eisens wird durch das Recycling alter Erythrozyten gewonnen. Rote Blutzellen haben im menschlichen Körper eine Lebensdauer von etwa 120 Tagen und werden anschließend – vor allem in den Makrophagen der Milz – abgebaut. Das dabei freigesetzte Eisen wird ins Plasma überführt, wo es gebunden an Transferrin an die Stellen des Bedarfs weitergeleitet wird. Der größte Teil des Eisens – etwa 30 mg pro Tag – wird für die Synthese neuer roter Blutzellen im Knochenmark benötigt. Abbildung 4 gibt einen Überblick über die Eisenverteilung im menschlichen Körper (Ganz, 2013; Pantopoulos et al., 2012).

1.3.2. Eisenabsorption

Hauptort der Eisenabsorption sind die Enterozyten des Duodenums. Das Nahrungseisen kann unterteilt werden in Häm-Eisen und Nicht-Häm-Eisen. Fleischhaltige Nahrung ist reich an Hämoglobin und Myoglobin, bei deren Abbau – bedingt durch den niedrigen pH-Wert des Magens und proteolytische Enzyme – Häm frei wird. Dessen Aufnahme in die Enterozyten erfolgt über Rezeptor-vermittelte Endozytose, möglicherweise mittels des Transportproteins HCP1 (Häm Carrier Protein 1). Häm zeigt eine sehr gute Verfügbarkeit. Obwohl bei einer in Mitteleuropa üblichen Ernährung der Anteil des Häms am Nahrungseisen nur 10-20 % beträgt, können bis zu 50 % des absorbierten Eisens aus dieser Quelle stammen. In der Zelle angekommen, wird Häm durch die Hämoxygenase 1 (HO1) abgebaut und das Eisen in seiner zweiwertigen Form freigesetzt (Nielsen, 2013).

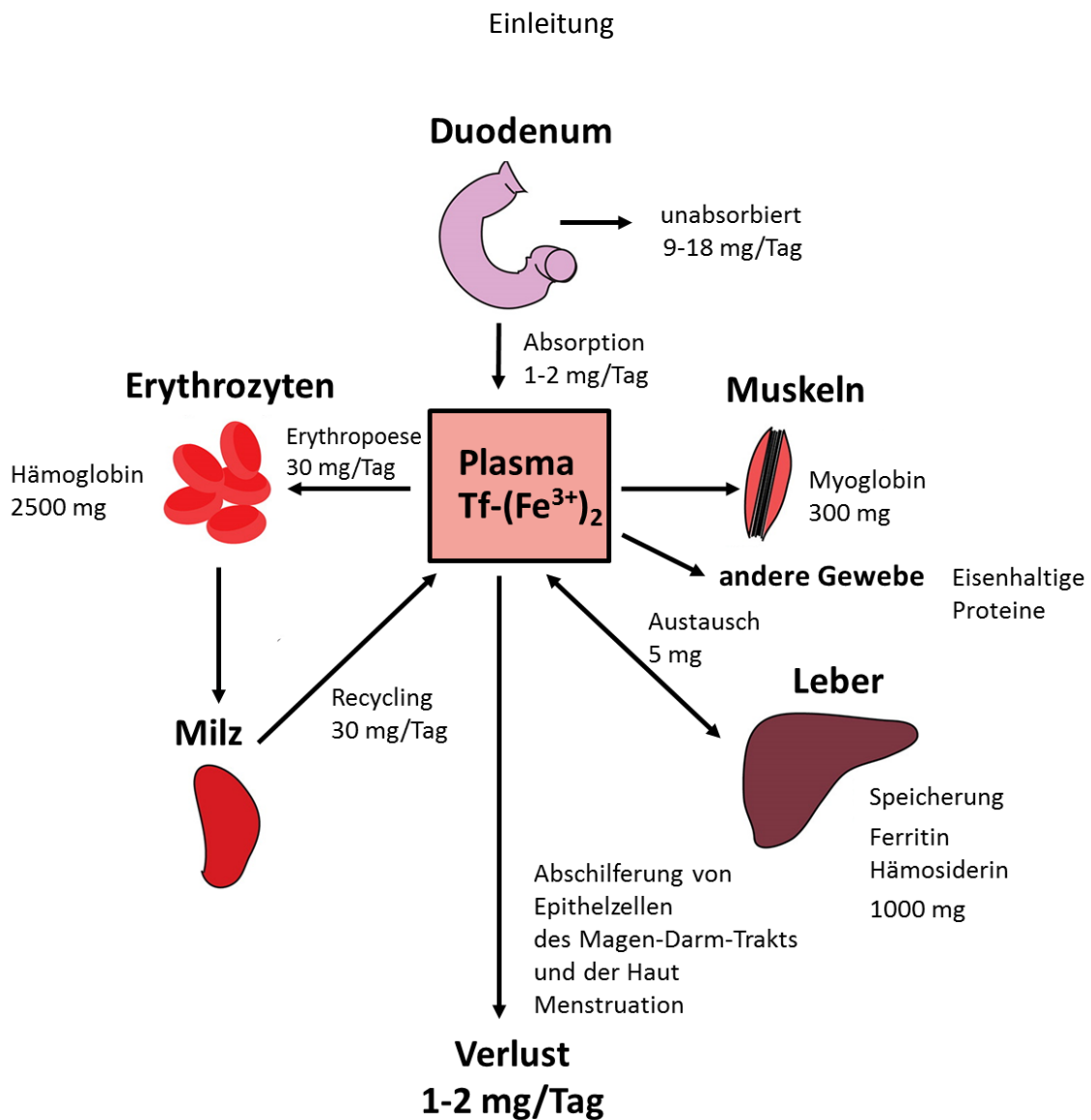


Abbildung 4: Eisenverteilung und -austausch im menschlichen Körper.

Täglich werden im Duodenum etwa 1-2 mg Eisen aus der Nahrung absorbiert, um Verluste zu kompensieren. Etwa 4 mg Eisen befinden sich in der Zirkulation gebunden an Transferrin (Tf-(Fe³⁺)₂). Von dort wird es an die Stellen des Bedarfs transportiert. Der Großteil des Eisens ist im erythroiden Kompartiment des Knochenmarks sowie in reifen Erythrozyten zu finden (2500 mg). Retikuloendotheliale Makrophagen verwerten das Eisen alter roter Blutzellen wieder und stellen es somit für die Synthese neuer Erythrozyten zur Verfügung. Die Hepatozyten der Leber speichern Eisen in Form von Ferritin oder Hämosiderin (1000 mg). Weitere Informationen sind im Text gegeben (modifiziert nach (Pantopoulos et al., 2012)).

Nicht-Häm-Eisen setzt sich aus Fe³⁺-Salzen, Fe³⁺-Hydroxyd-Kohlenhydrat-Komplexen und Ferritin zusammen. Das in diesen Formen enthaltene Fe³⁺ ist beim duodenalen pH-Wert von 5-7 nur schwer löslich und muss folglich erst zu Fe²⁺ reduziert werden. Dies erfolgt durch die Ferrireduktase Dcytb, welche im Bürstensaum der Enterozyten lokalisiert ist. Anschließend wird Fe²⁺ durch den divalenten Metallionen-Transporter 1 (DMT1) in die Zelle aufgenommen (Nielsen, 2013).

Verschiedene Nahrungsbestandteile können die Verwertbarkeit des Eisens steigern. So erhöht beispielsweise die reduktiv wirkende Ascorbinsäure oder die als Ligand wirkende Zitronensäure die Löslichkeit des Eisens im Gastrointestinaltrakt, wohingegen pflanzliche Phytate, Oxalate oder Tannine eine Absorptions-hemmende Wirkung haben, da sie mit Eisen unlösliche Präzipitate bilden. Pflanzliches Eisen hat daher eine schlechtere Bioverfügbarkeit als tierisches Eisen (Nielsen, 2013).

Das in die Enterozyten aufgenommene Eisen gelangt in den labilen intrazellulären Eisenpool. Von dort wird es entweder an Ferritin gebunden gespeichert und nach einigen Tagen mit der Darmepithelzelle abgeschilfert oder an der basolateralen Membran durch den Eisenexporter Ferroportin aus der Zelle transportiert. Letzteres stellt den Eintritt des Eisens in den Blutkreislauf dar. Auf extrazellulärer Seite wird Fe^{2+} durch Hephästin zu Fe^{3+} oxidiert, welches anschließend an das Transportprotein Transferrin bindet (Silva and Faustino, 2015).

1.3.3. Transport und zelluläre Aufnahme

Das Eisen-Transportprotein Transferrin kann maximal zwei Eisenatome binden. Normalerweise ist der Sättigungszustand von Transferrin mit Eisen nur zu etwa 30 % ausgeschöpft. Dies ermöglicht dem Organismus auf einen akuten Eisenanstieg zu reagieren und den toxischen Effekt freien Eisens zu vermeiden. Gebunden an Transferrin wird Eisen an die Stellen des Bedarfs befördert. Dort bindet es an den ubiquitär exprimierten Transferrin-Rezeptor 1 (TfR1), wird mit Hilfe Rezeptor-vermittelter Endozytose in die Zelle geschleust und über Vesikel zu den Endosomen transportiert. Der durch eine ATP-abhängige Protonenpumpe vermittelte H^+ -Einstrom führt zu einer Verminderung des pH-Wertes im Endosom und schließlich zur Befreiung von Fe^{3+} aus der Transferrin-Bindung. Mit Hilfe von Steap3 wird das gelöste Eisen zu Fe^{2+} reduziert und über DMT1 ins Zytoplasma entlassen. Der TfR1-Transferrin Komplex wird zur Plasmamembran gebracht und dadurch rezykliert. Das Fe^{2+} des labilen Eisenpools im Zytoplasma dient zur Häm-Synthese in den Mitochondrien oder kann bei Überschüssen an Ferritin gebunden gespeichert werden (Nielsen, 2013; Silva and Faustino, 2015).

1.3.4. Speicherung

Die Speicherung schützt bei erhöhtem Eisenlevel vor freiem zytotoxisch wirkendem Eisen und sorgt für die unmittelbare Verfügbarkeit des Elements bei Eisenmangel. Der wohl wichtigste Eisen-Speicherstoff ist das Protein Ferritin. Es besteht aus einer Apoproteinhülle mit 24 Untereinheiten, aufgebaut aus leichten (FLC) und schweren Ketten (FHC), die einen Eisenkern umhüllen. Ein Molekül Ferritin kann bis zu 4500 Eisenatome in seine sphärische Höhlung aufnehmen. Die FHC-Untereinheit katalysiert dabei die Oxidation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} , während FLC die Eisenaufnahme in den Kern fördert. Ferritin ist im Zytosol, im Zellkern und im Mitochondrium einer Zelle sowie im Serum zu finden. Vor allem in der Leber und im retikuloendothelialen System wird Eisen in Form von Ferritin gespeichert. Die Freisetzung des Eisens aus den Ferritin-Speichern scheint über lysosomale und Proteasom-vermittelte Degradierung zu erfolgen (Silva and Faustino, 2015).

Ein weiteres Eisenspeicherprotein ist Hämosiderin. Dabei handelt es sich um ein wasserunlösliches Granulat, welches reich an dreiwertigem Eisen ist. Hämosiderin kommt ausschließlich intrazellulär vor und entsteht wahrscheinlich durch die intralysosomale Aggregation und Degradation von Ferritin sowie die Ansammlung von Nukleotiden als auch Lipiden. Es ist in den so genannten Siderosomen, Membran-ähnlichen Strukturen, eingelagert. Die Mobilisierung des Eisens aus Hämosiderin erfolgt langsamer als aus Ferritin (Iancu, 1989; Koorts and Viljoen, 2007; Richter, 1978).

1.3.5. Recycling

Zur Aufrechterhaltung der Eisenhomöostase ist die Phagozytose alter Erythrozyten durch die retikuloendothelialen Makrophagen der Milz, der Leber und des Knochenmarks und das folgende Recycling des im Hämoglobin enthaltenen Häm-Eisens essentiell. Die Milz stellt hierbei das Hauptorgan für die Eisenwiederverwertung dar. Verschiedene biochemische Modifikationen der Erythrozytenmembran im Rahmen des Alterungsprozesses oder des programmierten Zelltods lassen Makrophagen die zu eliminierenden roten Blutzellen erkennen. Dazu zählen Veränderungen des erythroiden Anionen-Austauschers 1 (SLC4A1), die Exposition des Phospholipids Phosphatidylserin an der Zelloberfläche, die Verminderung der Membranflexibilität sowie die Abnahme von Sialinsäure oder Antigen CD47 an der

Erythrozytenoberfläche. Nach Bindung der gealterten Erythrozyten an die Makrophagen werden diese mittels Phagozytose internalisiert und im Phagolysosom degradiert. Reaktive Sauerstoffspezies und hydrolytische Enzyme führen zur Freisetzung von Häm, welches mit Hilfe der Hämoxigenase 1 zu Eisen, Kohlenmonoxid und Bilirubin gespalten wird. Das freigewordene Eisen kann durch DMT1 ins Zytosol und anschließend mit Hilfe des Eisenexporters Ferroportin ins Plasma transportiert werden, wo es nach Oxidation durch Ceruloplasmin an Transferrin bindet (Silva and Faustino, 2015).

1.3.6. Hepcidin – Regulator der systemischen Eisenhomöostase

Der Hauptregulator der systemischen Eisenhomöostase ist Hepcidin, ein 25 Aminosäuren langes Peptid-Hormon, das überwiegend in den Hepatozyten der Leber exprimiert wird. Das Gen, welches für Hepcidin kodiert, ist *Hamp*. Hepcidin wird zunächst als 84 Aminosäuren langes Prä-Propeptid mit einem Signalpeptid aus 24 Aminosäuren, einer Proregion und der 25 Aminosäuren langen C-terminalen bioaktiven Sequenz synthetisiert. Durch die Bindung an seinen Rezeptor Ferroportin führt Hepcidin zu dessen Internalisierung und lysosomalen Degradierung. Das Hormon hemmt somit die Eisenabgabe aus den Enterozyten des Duodenums, die Freisetzung des wiederverwerteten Eisens der Makrophagen und die Mobilisierung der Eisenspeicher der Hepatozyten und anderer Zellen. Abbildung 5 gibt einen Überblick über die Regulierung der systemischen Eisenhomöostase im Körper. Die Gen-Expression von Hepcidin wird durch die Eisenlevel und Eisenspeicher, die Erythropoese, die Hypoxie sowie durch Entzündungsmediatoren gesteuert (Ganz, 2013; Park et al., 2001).

Es gibt verschiedene Signalwege der HAMP-Expression. In eine dieser Signalkaskaden sind BMPs, eine Gruppe von parakrin wirkenden Signalpeptiden, involviert. Bei hohen hepatischen Eisenlevel wird BMP6 vermehrt exprimiert und bindet in Gegenwart des Korezeptors Hämajuvelin an die BMP-Rezeptoren I und II. Der aktivierte Rezeptorkomplex löst die Phosphorylierung der SMAD-Proteine 1/5/8 aus, welche zusammen mit SMAD 4 in den Zellkern translozieren und dort durch die Bindung an BMP-responsive Elemente die Expression von Hepcidin initiieren. Die Transmembranöse Protease Serin 6 proteolysiert den Korezeptor Hämajuvelin und hemmt somit die Hepcidin-Synthese (Nielsen, 2013).

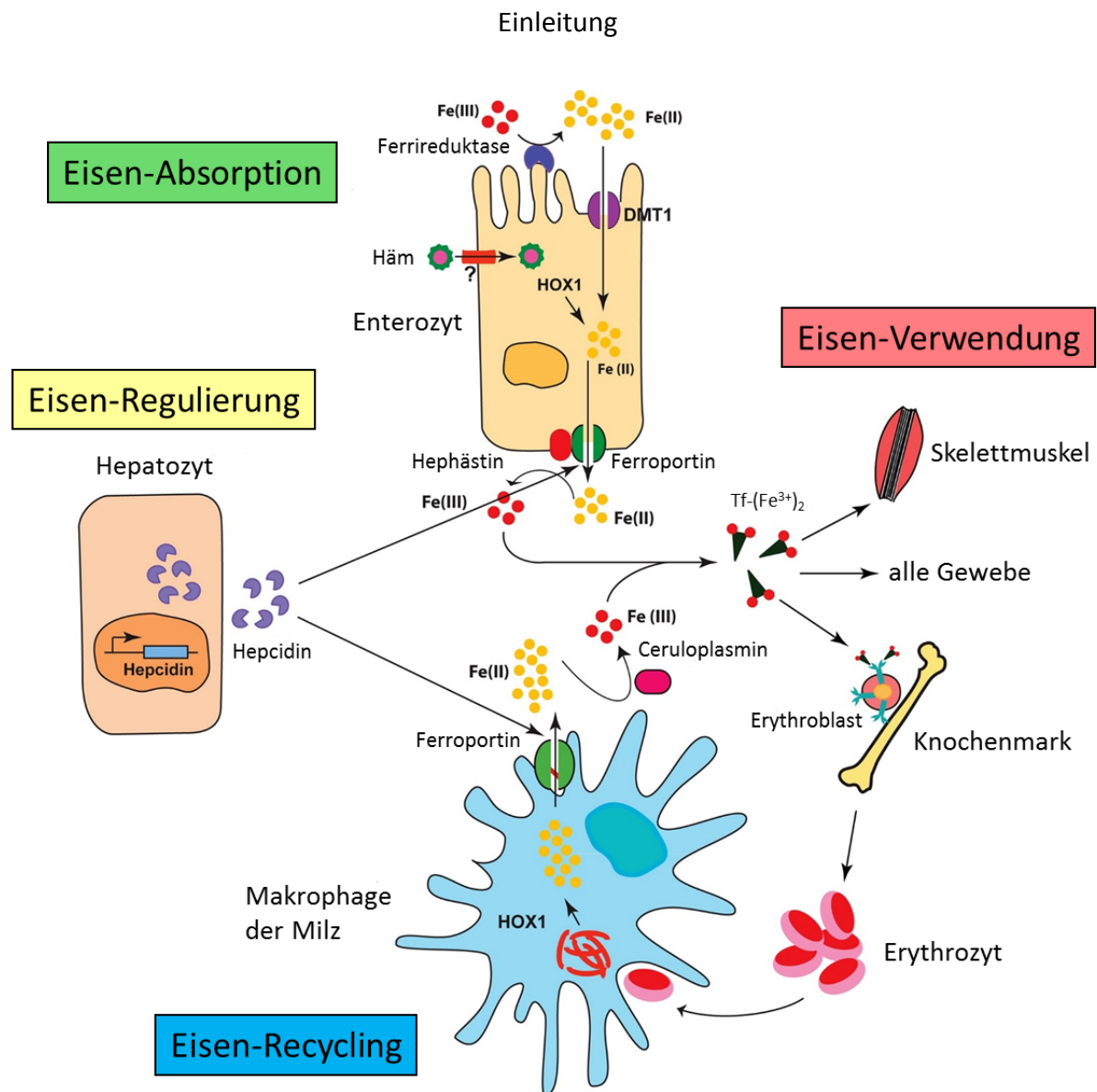


Abbildung 5: Die Regulation des systemischen Eisenstoffwechsels.

Duodenale Enterozyten absorbieren Nahrungs-Eisen über den divalenten Metalltransporter 1 (DMT1) nach Reduktion von Fe^{3+} zu Fe^{2+} durch Ferrireduktasen. Retikuloendotheliale Makrophagen der Milz verwerten Eisen aus alten Blutzellen wieder. Beide Zellen exportieren das Element über Ferroportin in die Zirkulation, wo es durch Hephästin bzw. Ceruloplasmin zu Fe^{3+} oxidiert und gebunden an Transferrin im Blut transportiert wird. Im Knochenmark besteht bei der Synthese neuer roter Blutzellen der größte Bedarf. Das hepatische Hormon Hepcidin reguliert die Eisen-Freisetzung aus den Zellen, indem es die Stabilität von Ferroportin beeinflusst. Die Synthese von Hepcidin wird durch das Eisenlevel des Körpers, Entzündungen, Hypoxie und die Erythropoese beeinflusst (modifiziert nach (Pantopoulos et al., 2012)).

Ein weiterer Signalweg erfolgt unter Beteiligung des hereditären Hämochromatose-Proteins HFE. Bei Eisenhomöostase ist das Membranprotein HFE partiell an den Transferrin-Rezeptor 1 (TfR1) gebunden. Erhöht sich der Plasma-Eisen-Spiegel, so bindet der TfR1 an mit Eisen beladenes Transferrin ($\text{Tf-(Fe}^{3+}\text{)}_2$ bzw. Holotransferrin) und verdrängt dadurch HFE. HFE assoziiert folglich mit dem überwiegend in der Leber lokalisierten Transferrin-Rezeptor 2 (TfR2), welcher eine wesentlich geringe Affinität für $\text{Tf-(Fe}^{3+}\text{)}_2$ hat als TfR1.

Bei sehr hohen Plasma-Eisen-Spiegeln bindet der TfR2 Holotransferrin und der Komplex Tf-(Fe³⁺)₂-TfR2-HFE initiiert auf unterschiedlichen Wegen die HAMP-Expression (Silva and Faustino, 2015).

Die Hepcidin-Synthese kann zudem durch inflammatorische Zytokine wie Interleukin-6 (IL-6) stimuliert werden. Die Ligandenbindung an den IL-6 Rezeptor führt zur Jak-2-vermittelten Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3, welcher nach Translokation in den Zellkern an eine spezifische Region im HAMP-Promotor bindet und damit die Expression induziert (Silva and Faustino, 2015).

Im Gegensatz dazu hat der HIF1 (Hypoxie induzierter Faktor 1) bei Hypoxie eine inhibierende Wirkung auf die HAMP-Transkription. Die Erythropoese wirkt ebenfalls hemmend, vermutlich über das Hormon Erythroferron (Kautz et al., 2014; Silva and Faustino, 2015).

1.3.7. Zelluläre Regulation der Eisenhomöostase durch IRPs

Die intrazelluläre Eisenhomöostase wird auf post-transkriptioneller Ebene durch die Eisen-regulierenden Proteine IRP1 und IRP2 gesteuert. Diese binden an die IREs („Iron responsive elements“), cis-regulatorische Sequenzelemente mit Haarnadelstruktur, welche sich in den nicht-translatierten Bereichen (UTRs) von in den Eisenstoffwechsel involvierten mRNAs (Boten-Ribonukleinsäuren) befinden (Hentze et al., 2010).

mRNAs, welche beispielsweise für das Speicherprotein Ferritin (FLC oder FHC) oder den Eisenexporter Ferroportin kodieren tragen im 5'-untranslatierten Bereich (5'UTR) ein IRE. Bei niedrigem intrazellulären Eisenlevel binden IRP1 und IRP2 an das IRE und hemmen dadurch die Translation, sodass in Folge weniger Eisen gespeichert (FLC/FHC) als auch exportiert (Ferroportin) wird. Befindet sich das IRE in der 3'-UTR einer mRNA, wie z.B. bei TFR1, so wird die RNA durch IRP-Bindung stabilisiert und dementsprechend die Translation und dadurch die Proteinmenge erhöht. Bei Eisendefiziten in der Zelle wird somit die Eisenaufnahme durch den Transferrin-Rezeptor 1 (TfR1) verstärkt (Hentze et al., 2010). Ist Eisen im Überschuss vorhanden, so interagiert IRP2 (und auch IRP1) mit dem Adapter-Protein FBXL5 („F-Box And Leucine-Rich Repeat Protein 5“), welches den SCF (SKP1-CUL1-F-box) E3 Ligase-Komplex rekrutiert, was zur Ubiquitinierung und folgender proteasomaler Degradierung von IRP2 führt. Die Hämyerthrin-ähnliche Domäne von FXBL5 dient hierbei als ein Eisensensor: Bei Eisenbindung wird FXBL5 stabilisiert, andernfalls degradiert. IRP1 ligiert bei Eisenüberschuss

Einleitung

ein Eisen-Schwefel-Cluster ([4Fe-4S Cluster]) und agiert als zyttoplasmatische Aconitase (Hentze et al., 2010).

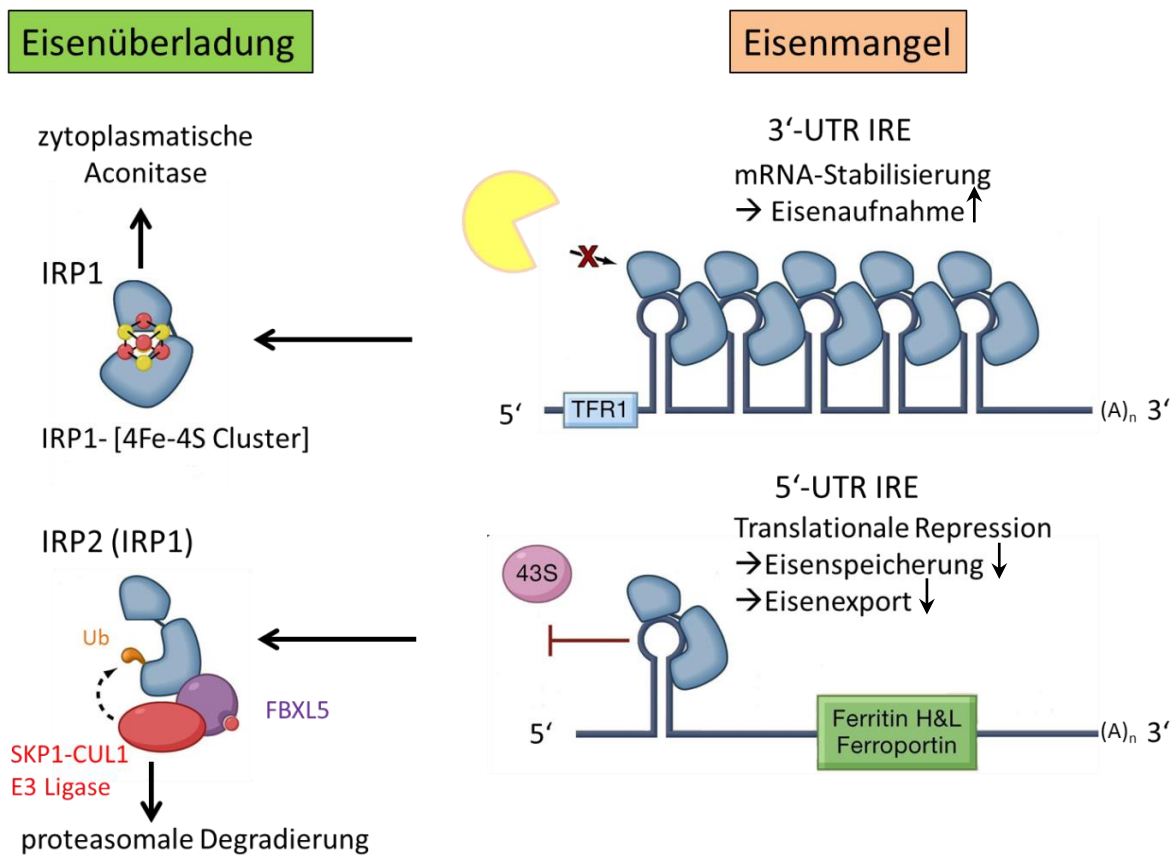


Abbildung 6: Die Regulation der zellulären Eisenhomöostase.

Bei Eisenmangel in der Zelle binden Eisen-regulierende Proteine (IRP1 oder IRP2) an die Eisen-responsiven Elemente (IREs) in den nicht-translatierten Bereichen (UTRs) von in den Eisenstoffwechsel involvierten mRNAs. Die Bindung an die IREs in 5'UTRs (Ferritin, Ferroportin) führt zur Repression der Translation und somit zu einer geringeren Proteinmenge, wohingegen die Interaktion mit den IREs in 3'-UTRs (TFR1) zu einer Stabilisierung der mRNA und folglich zu einer erhöhten Proteinmenge führt.

Bei Eisenüberladung interagiert IRP2 (und auch IRP1) mit dem Adapter-Protein FBXL5, das den SCF E3 Ligase-Komplex rekrutiert, was zur Ubiquitinierung und nachfolgender proteasomaler Degradierung von IRP2 (und IRP1) führt. IRP1 ligiert bei Eisenüberschuss ein Eisen-Schwefel-Cluster ([4Fe-4S Cluster]) und agiert als zyttoplasmatische Aconitase (modifiziert nach (Hentze et al., 2010)).

1.3.8. Eisenerkrankungen

Wie in 1.3. beschrieben wird Eisen für eine Vielzahl von Funktionen benötigt. Dementsprechend sind unangemessen hohe oder niedrige Eisenlevel schädlich und führen zu einem breiten Spektrum an Krankheiten. Eisenüberladung oder -mangel kann vererblich oder erworben sein (Chifman et al., 2014).

Im Folgenden soll lediglich auf die wichtigsten durch Eisenmangel bedingten Erkrankungen eingegangen werden:

- Eisenmangel ist der häufigste Grund für eine Anämie (Eisenmangelanämie) und ergibt sich aus einem langfristigen Ungleichgewicht zwischen Bedarf und Aufnahme. Der erhöhte Bedarf kann z.B. durch kindliches Wachstum, eine Schwangerschaft, Blutverlust, u.a. auch gastrointestinale Blutungen, Ösophagus-, Magen- oder Kolonkrebs bedingt sein. Eisenarme Ernährung und Malabsorption sowie gastrointestinale Erkrankungen sind Gründe für die verminderte Aufnahme. Mögliche Folgen der Mangelercheinung sind Frühgeburt, Wachstumsstörungen, verminderte kognitive Fähigkeiten und Beeinflussung des Nervensystems. Zu den typischen Symptomen einer Eisenmangelanämie zählen chronische Müdigkeit, niedrigere Belastungstoleranzen, Kopfschmerzen und Konzentrationsstörungen. Unbehandelt kann sie zu unregelmäßigen Herzschlag, Herzinfarkt, geringem Geburtsgewicht und erhöhtem Infektionsrisiko und verzögertem Wachstum in der Kindheit führen. Veränderte Ernährung und orale Eisenpräparate können leichte Mängel beheben, schwerer Eisenmangel wird mit Bluttransfusionen und Eiseninjektionen behandelt (Andrews, 1999; Chifman et al., 2014).
- Die refraktäre Eisenmangelanämie ist bedingt durch eine seltene, rezessiv vererbte Mutation im Gen Tmprss6. Diese führt zu einer verminderten Aktivität der Transmembranösen Protease Serin 6 und folglich zu erhöhten Hepcidin-Level, wodurch die Eisenabsorption als auch die Eisenspeicherung in Makrophagen reduziert ist. Diese Form der Anämie reagiert nicht auf eine orale oder intravenöse Eisentherapie (Chifman et al., 2014; Hentze et al., 2010).
- Die Anämie bedingt durch chronische Erkrankungen tritt in Verbindung mit bösartigen Tumoren, chronischen Infektionen, Traumata, entzündlichen Erkrankungen und Organschäden auf. Die Eisenspeicher sind in der Regel nicht erschöpft, aber das Eisen wird in den Makrophagen zurückgehalten. Durch den Hepcidin-Anstieg als Antwort auf die Entzündung ist die Eisenabsorption reduziert und die Hämoglobin-Synthese gehemmt. Entzündliche Zytokine wie IL-6, bakterielle Pathogene und Lipopolysaccharide induzieren die Hepcidin-Synthese. Die Behandlung richtet sich in der Regel nach der vorliegenden Krankheit (Chifman et al., 2014; Silva and Faustino, 2015).

1.4. Ziele der Arbeit

Vorausgegangene Veröffentlichungen zeigten, dass cGKI-defiziente Mäuse eine Anämie entwickeln. Als Ursache für die Blutarmut wurde das Fehlen der cGKI in den Erythrozyten und die dadurch bedingte Eryptose und verkürzte Lebenszeit der Zellen genannt (Foller et al., 2008). Die Ergebnisse hinsichtlich der Expression der cGKI in Erythrozyten und ihren Vorläuferzellen waren jedoch widersprüchlich: so zeigten immunhistochemische Untersuchungen des Knochenmarks keine cGKI in den Erythroblasten (Weber et al., 2007). Im Gegensatz dazu waren Erythroblasten bzw. Erythrozyten, welche immunomagnetisch unter Verwendung von anti-Ter119-Microbeads isoliert wurden, cGKI-positiv (Foller et al., 2008). Um Klarheit zu schaffen, sollte die Expression der cGKI in erythroiden Zellen erneut analysiert werden.

Vorversuche am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München ließen zudem Eisenmangelerscheinungen bei cGKI-defizienten Mäusen erkennen. Außerdem war bekannt, dass cGKI KO- und cGKI-Rescue-Mäuse aufgrund der verminderten Bikarbonatsekretion ein Ulcus im Duodenum entwickeln (Singh et al., 2012). Auch dies erschien ein möglicher Grund für die Anämie zu sein.

Aufgabe dieser Doktorarbeit war es, die dominierende Ursache für die Anämie und den Eisenmangel zu finden, die Rolle der cGKI im Eisenstoffwechsel zu analysieren und den Zusammenhang zwischen Blutarmut und Eisenmangel aufzuzeigen.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden – soweit nicht anders angegeben – von Sigma-Aldrich, Carl Roth, Sarstedt, Biochrom und Merck bezogen.

Beschreibung	Hersteller
96-Well Platte + Schutzfolie (qRT-PCR)	Applied Biosystems
Agarose	Biozym
Amersham™ ECL Select™ Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare
BC-Assay Protein Quantification Kit	Uptima
DePex Mounting Medium	Thermo Fisher Scientific
DNA Standard (1 Kb Plus DNA Ladder)	Invitrogen
CELLlection™ Biotin Binder Kit	Invitrogen
Colorless GoTaq® Flexi Buffer (5x)	Promega
dNTPs (10 mM)	Invitrogen
DTT (0,1 M)	Invitrogen
FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)	Roche
Haemocult®-Test	Beckmann Coulter
Heparin-Natrium (25000 I.E./5 ml)	Ratiopharm
IL-6 Immunoassay Quantikine® ELISA Kit (Mouse)	R&D Systems
Isotone Kochsalzlösung	Braun
Isofluran	CP-Pharma
Kanülen	Braun
PeqGOLD RNApure	Peqlab
Precision Plus Protein™ All Blue Standard	Bio-Rad
Probenröhrchen für hämatologische Untersuchungen (50 µl)	Kabe Labortechnik
Proteaseinhibitor Cocktail Set V	Calbiochem
Proteinase K	Roche Applied Science
QuantiChrom™ Iron Assay Kit	BioAssay Systems
RNase Inhibitor	Invitrogen
SuperScript II Reverse Transkriptase	Invitrogen
Venofer® (Eisen-(III)-hydroxid-Saccharose- Komplex)	Vifor

2.2. Geräte

Gerät	Hersteller
4°C Kühlschrank	Liebherr
-20°C Tiefkühler	AEG
-80°C Tiefkühler HERAfreeze	Thermo Fisher Scientific
Agarosegelkammer	MWG Biotech
Akku-Pipettierhilfe Pipetboy	Integra Biosciences
Analysenwaage APX-60	Denver Instrument
Autoklav Systec 3850 ELVC	tuttnauer
Geldokumentation Dark Hood DH-40/50	biostep
Hämatologieautomaten XT2000iV	Sysmex
LAS-4000 mini Chemilumineszenzdetektor	Fujifilm
Magnetrührer Combimag RCH/RCT	IKA Labortechnik
Mikrotom Microm HM 340E	Thermo scientific
MiniProtean Tetracell Gelkammer und Zubehör	Biorad
Mikroskop AxioObserver.Z1	Zeiss
Multifunktionsmischer Roto-Shake Genie	Carl Roth
Multiskan FC Fotometer	Thermo Fisher Scientific
NanoDrop ND-1000	Peqlab
PCR-Maschine Biometra T Gradient	Biometra
pH-Meter 766 Calimatic	Knick
Pipettierhilfe Pipetman (10, 20, 200, 1000)	Gilson
Präparationsbesteck (Pinzette, Präzisionsschere)	World Precision Instruments
Reinstwasseranlage Gen Pure Pro UV/UF	Thermo Scientific
Semi-Dry-Blotter Maxi	Carl Roth
Standard Powerpack P25 Spannungsquelle	Biometra
StepONE Plus Cyclor	Applied Biosystems
T 10 basic ULTRA-TURRAX	IKA
Thermocycler peqstar	Peqlab
Thermomixer Compact	Eppendorf
Tischzentrifuge	Neolab
Vortex-Mixer	NeoLab
Waage Explorer Pro EP612CM	Ohaus
Zentrifuge Eppendorf Centrifuge 5810R	Eppendorf

2.3. Verwendete Mauslinien

Als Versuchstiere wurden genetisch veränderte cGKI-Knockout (cGKI^{-/-} bzw. cGKI KO)- und cGKI β -Rescue (β -Res.)-Mäuse und deren Wildtyp (WT)-Geschwister verwendet.

Bei den cGKI KO-Mäusen wurde das *prkg1* Gen, welches für die cGMP-abhängige Proteinkinase I kodiert, inaktiviert, sodass diese Tiere keine cGKI mehr exprimieren (Pfeifer et al., 1998).

Die cGKI β -Rescue-Mäuse sind auf einen cGKI-defizienten Hintergrund gezüchtet, exprimieren die β -Isoform der cGKI jedoch unter Kontrolle des Glattmuskel-spezifischen SM22 α -Promotors. Die Expression der cGKI β ist somit ausschließlich in glatten Muskelzellen wiederhergestellt (Weber et al., 2007).

Beide Mauslinien sind auf den genetischen Hintergrund SV129 gezüchtet. Für die Versuche wurden überwiegend männliche Tiere verwendet.

2.4. Versuchstierhaltung

Alle Versuchstiere stammten aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München. Die Tiere wurden gemäß den deutschen Tierschutzrichtlinien in Temperatur-kontrollierten Räumen mit zwölfstündigem Hell-Dunkel-Rhythmus in Makrolon Käfigen vom Typ II oder Typ III gehalten und erhielten Wasser und Futter *ad libitum*.

Beim Futter wurde unterschieden zwischen einer Standard- und einer Spezialdiät (+PPI).

Die Spezialdiät beinhaltete zusätzlich 18 mg/kg des Protonenpumpenhemmers Esomeprazol (Nexium® Granulat), welcher in Form von MUPS® („multiple-unit pellet systems“) vom Futtermittelhersteller Altromin gleichmäßig in die Nahrung eingearbeitet wurde. Sofern angegeben (+PPI) erhielten die Nachkommen und das jeweilige Muttertier die Spezialdiät ab Geburt des Nachwuchses. Die Jungtiere wurden im Alter von 4-5 Wochen von ihren Müttern separiert.

2.5. Genotypisierung der experimentell verwendeten Mäuse

2.5.1. Isolierung von genomischer DNA aus Mausgewebe

Um den Genotyp der Nachkommen zu bestimmen, ist zunächst die Isolierung genomischer Desoxyribonukleinsäure (DNA) notwendig. Hierfür wurde der jeweiligen Maus 7 bis 10 Tage nach der Geburt Schwanzgewebe entnommen und diese Gewebeprobe bei 56°C über Nacht in Lysepuffer (Tabelle 1) verdaut. Der Detergens-haltige Puffer (Colorless GoTaq® Flexi Buffer) solubilisiert die Zellmembran und die zugesetzte Proteinase K inaktiviert endogene RNasen und DNasen und baut Proteine ab. Am darauffolgenden Morgen wurde die Proteinase K durch 15-minütiges Kochen bei 95°C inaktiviert und 1 µl des DNA-Ansatzes für die PCR-Analyse verwendet (siehe 2.5.2.).

Tabelle 1. Lysepuffer für eine Gewebeprobe		
H ₂ O _{bidest.}	79	µl
5x Colorless GoTaq® Flexi Buffer	20	µl
Proteinase K (50 mg/ml)	1	µl

2.5.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion („Polymerase Chain Reaction“, PCR) ist eine Methode zur in vitro Vervielfältigung von definierten DNA-Sequenzen (Mullis and Faloona, 1987; Saiki et al., 1988). Das Verfahren lässt sich in einen Denaturierungs-, einen Hybridisierungs- und einen Elongationsschritt unterteilen, welche zyklisch wiederholt werden.

Die Denaturierung erfolgt bei 94°C und bewirkt das Aufschmelzen der DNA in ihre Einzelstränge. Im Anschluss kommt es bei 55°C-65°C zur Hybridisierung der spezifischen Oligonukleotidprimer an die komplementären Einzelstränge („Annealing“). Die zwei im Überschuss vorhandenen Primer (Forward und Reverse Primer) werden so gewählt, dass sie das zu amplifizierende DNA-Stück flankieren. Im nächsten Schritt, der Elongation, wird ausgehend von dem kurzen doppelsträngigen Primer-DNA-Hybrid der fehlende DNA-Strang in 5'→3'-Richtung synthetisiert. Die Temperatur wird hierbei auf 72°C, dem Temperaturoptimum der thermostabilen Taq-Polymerase, erhöht. Da die Komplementierung

an beiden DNA-Strängen abläuft, kommt es im Idealfall mit jedem Zyklus zu einer Verdoppelung der von Primern flankierten DNA-Sequenz. Durch die mehrfache Wiederholung eines Reaktionszyklus bestehend aus Denaturierung, Hybridisierung und Elongation wird eine exponentielle Amplifikation des jeweiligen DNA-Abschnittes erreicht.

Zur genomischen Charakterisierung der Nachkommen wurden für jede Mauslinie spezifische PCR-Analysen nach dem Reaktionsansatz in Tabelle 2 durchgeführt. Die Sequenzen der eingesetzten Primer befinden sich im Anhang. Es wurde der Thermocycler Pqstar 96X Universal mit dem in Tabelle 4 aufgeführten Programm verwendet. Hybridisierungstemperatur und -zeit des PCR-Protokolls variierten je nach eingesetzten Primern und Größe des Amplifikats.

Tabelle 2. Standard- Reaktionsansatz		
REDTaq®ReadyMix™PCR Reaction Mix 2x	12,5	µl
Primer A (25 pmol/µl)	0,5	µl
Primer B (25 pmol/µl)	0,5	µl
Primer C (25 pmol/µl)	0,5	µl
H ₂ O _{bidest.}	10	µl
DNA	1	µl

Tabelle 3. Zusammensetzung REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix 2x
20 mM Tris-HCl (pH 8,3)
100 mM KCl
3 mM MgCl ₂
0,002 % Gelatine
0,4 mM dNTP Mix (dATP, dCTP, dGTP, TTP)
0,06 Units/µl Taq DNA Polymerase
Stabilisatoren, roter inerter Farbstoff

Tabelle 4. PCR-Protokoll		
	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	94°C	5 min
Denaturierung	94°C	10 sec
Hybridisierung	55°C-62°C	20-45 sec
Elongation	72°C	30 sec
Finale Elongation	72°C	5 min

} x 35

2.5.3. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Analyse der PCR-Produkte aus 2.5.2.

Nukleinsäuren sind aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückrates negativ geladen und wandern im elektrischen Feld zur Anode. Die Poren des Agarose-Gels wirken dabei wie ein Sieb und beeinflussen die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente. Kleine, lineare Nukleinsäure-Stränge bewegen sich schneller durch das Gel als große zirkuläre DNA-Fragmente. Somit erfolgt eine Auftrennung der Stränge nach ihrer Größe und Konformation. Der im REDTaq®ReadyMix™ PCR Reaction Mix enthaltene Farbmärker ermöglicht eine Verfolgung des Elektrophoreseverlaufs der PCR-Produkte aus 2.5.2. Die aufgetrennten DNA-Fragmente sind nativ nicht sichtbar und werden deshalb mit Ethidiumbromid angefärbt. Dieser Farbstoff interkaliert zwischen die Basen der DNA, wodurch sich sein Anregungsspektrum verändert. Bei Anregung im UV-Licht wird die Fluoreszenz des Farbstoffs stark erhöht, sodass die PCR-Produkte als Banden sichtbar sind. Als Referenz wurde ein DNA-Standard (Tabelle 6), der DNA-Stücke definierter Länge enthält, aufgetragen.

Alle PCR-Produkte waren kleiner als 1000 kb, wodurch ausschließlich engmaschige 2 %ige Agarosegele verwendet wurden. Zur Herstellung des Gels wurde Agarose in 1x Tris-Borat-EDTA-Puffer in der Mikrowelle bei 1000 W bis zur vollständigen Lösung der Agarose aufgeköcht, nach Abkühlung auf etwa 50°C mit 0,75 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und unter Vermeidung von Luftblasen in einen Gelschlitten mit eingesetzten Gelkämme gegossen. Das feste Gel wurde anschließend in die Elektrophoresekammer gegeben und mit 1x TBE überschichtet. Nach dem Entfernen der Gelkämme wurden die Proben und der DNA-Standard

in die Geltaschen pipettiert und eine Spannung von 200 V angelegt. Die Auswertung des Gels mit den für jede Mauslinie charakteristischen Banden erfolgte mit dem Geldetektor Dark Hood DH-40/50 unter UV-Licht.

Tabelle 5. 10x Tris-Borat-EDTA (TBE)		
Tris-HCl	540	g
Borsäure	275	g
EDTA	37	g
H ₂ O _{bidest.}	ad 5	l

Tabelle 6. DNA-Standard		
1 kb Plus DNA Ladder	280	µl
6x DNA-Ladepuffer	800	µl
H ₂ O _{bidest.}	3800	µl

Tabelle 7. 6x DNA-Ladepuffer		
Ficoll Typ 400	18	g
10x TBE	60	ml
0,5 M EDTA (pH 8,0)	24	ml
Bromphenolblau (50 mg/ml)	3	ml
Xylencyanol FF (50 mg/ml)	3	ml
H ₂ O _{bidest.}	ad 100	ml

2.6. Proteingewinnung und -analyse

2.6.1. Proteingewinnung aus murinem Gewebe

Die Maus wurde durch zervikale Dislokation euthanasiert, auf dem Rücken fixiert und mit Ethanol desinfiziert. Anschließend wurde das Gewebe nach Inzision der Bauchwand entnommen, in eiskalter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) von Fett und umgebendem Gewebe befreit und danach unverzüglich in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um den Proteinabbau durch intrazelluläre Proteasen zu verhindern.

Zum Zellaufschluss wurde das gefrorene Gewebe auf Trockeneis in einem vorgekühlten Mörser zwischen mehreren Schichten Alufolie mit einem vorgekühlten Pistill zerkleinert. Das dabei entstandene Pulver wurde in ein Reaktionsgefäß überführt, pro 10 mg Gewebe 100 µl 2 % SDS/50 mM Tris-Lösung (pH 7,4) zugegeben und 15 min bei 95°C unter mehrfachem

Vortexen gekocht. Im Anschluss wurde 5 Minuten bei 18000 x g zentrifugiert, der Überstand mit Proteaseinhibitor-Mix versetzt und die Aliquote bei -80°C eingefroren.

2.6.2. Quantitative Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure-Test

Die Konzentrationsbestimmungen der Proteinlösungen aus 2.6.1. erfolgte mit Hilfe des BC-Assay Protein Quantification Kits von Uptima. Der BCA-Test beruht darauf, dass Cu^{2+} -Ionen im alkalischen Milieu mit Proteinen Komplexe formen und dabei zu Cu^{+} -Ionen reduziert werden. Diese bilden mit Bicinchoninsäure im stöchiometrischen Verhältnis 1:2 violette Farbkomplexe, welche photometrisch vermessen werden können (Smith et al., 1985).

Eine Standardverdünnungsreihe von Bovinem Serum Albumin im Konzentrationsbereich von 10-100 ng/ μl diente der Erstellung einer Eichkurve. Um innerhalb des Linearitätsbereichs dieser Kurve zu bleiben, wurden 1:50- bis 1:500-Verdünnungen der Proben erstellt. 2 x 50 μl der Proteinverdünnungen und der Standardlösungen wurden mit 200 μl Reaktionslösung bestehend aus BC Assay Reagent A und B (Verhältnis 50:1) versetzt, 45-60 Minuten bei 60°C inkubiert, 200 μl jedes Ansatzes in eine Mikrotiterplatte überführt und bei 560 nm mit dem Multiskan™ FC Photometer vermessen. Die aus den Absorptionen des Standards ermittelte Geradengleichung diente der Errechnung der gesuchten Proteinkonzentrationen.

2.6.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli (Laemmli, 1970) handelt es sich um ein Verfahren zur Auftrennung von Proteingemischen nach ihrem Molekulargewicht. Proteine binden das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS), wodurch sie ihre Eigenladungen maskieren. Es resultiert eine negative Gesamtladung, sodass die Protein-SDS-Mizellen im elektrischen Feld zur Anode wandern. Die Anzahl der gebundenen SDS-Moleküle ist proportional zum Molekulargewicht der Proteine. Neben SDS tragen Hitzebehandlung und Zusatz von Dithiothreitol (DTT), welches Disulfidbrücken zwischen Cysteinen spaltet, zur Linearisierung der Proteine bei. Dadurch ist die Auftrennung der Proteine unabhängig von Eigenladung und Struktur, sondern erfolgt lediglich nach Größe. Das SDS-Polyacrylamidgel besteht aus einem Trenn- und einem Sammelgel, wobei die Proteine zunächst im Sammelgel aufkonzentriert und anschließend im engmaschigen Trenngel aufgetrennt werden.

Das 12 %ige Trenngel wurde nach Tabelle 8 hergestellt, in die Gießvorrichtungen gefüllt und mit 100 %igen Ethanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde der Ethanol entfernt, mit Wasser nachgespült, das Sammelgel aufgegossen und ein Kamm zur Taschenformung eingesetzt. War das Gel ausgehärtet, so wurde es in die Elektrophoresekammer des Mini-Protean-Systems eingespannt und mit 1x Elektrophoresepuffer aufgefüllt.

Tabelle 8. Trenn- und Sammelgel			
	Trenngel 12 %	Sammelgel	
29:1 Acrylamid	3	0,325	ml
4x Tris/ SDS (pH 8,8)	1,875	-	ml
4x Tris /SDS (pH 6,8)	-	0,625	ml
H ₂ O bidest	2,625	1,525	ml
APS (Ammoniumpersulfat)	25	6,25	µl
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	5	2,5	µl

Tabelle 9. Sammelgel- und Trenngelpuffer			
	4x Tris/SDS pH 6,8 (Sammelgelpuffer)	4x Tris/SDS pH 8,8 (Trenngelpuffer)	
Tris Base	6,04	18,2	g
SDS	0,4	0,4	g
H ₂ O bidest	ad 1000	ad 1000	ml

Die zu separierenden Proteinproben wurden mit 4x Lämmli versetzt, mit bidestilliertem Wasser auf 30 µl aufgefüllt und 5 Minuten bei 95°C gekocht. Nach Entfernen des Gelkammes und Spülen der Taschen mit Elektrophoresepuffer erfolgte das Auftragen der Proben. Als Proteinstandard diente Precision Plus Protein™ All Blue Standard. Zum Durchlaufen des Sammelgels wurde zunächst eine Spannung von 60 V angelegt. Im Trenngel wurde die Elektrophorese bei 100 V fortgesetzt, bis die durch Bromphenolblau markierte Lauffront am Ende des Gels angekommen war.

Tabelle 10. 10x Elektrophoresepuffer		
Tris Base	30,2	g
Glycin	144	g
SDS	10	g
H ₂ O bidest	ad 1000	ml

Tabelle 11. 4x Lämmli-Puffer		
1 M Tris (pH 6,7)	10	ml
20 % SDS	12,5	ml
Bromphenolblau	20	mg
Glycerin	20	ml
DTT	2	mg
H ₂ O bidest	ad 50	ml

2.6.4. Western Blot

Zur Identifizierung und Charakterisierung der aufgetrennten Proteine des SDS-Gels, wurden diese per Semidry-Verfahren elektrophoretisch auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran übertragen und anschließend mit Hilfe spezifischer Antikörpern detektiert (Kyhse-Andersen, 1984).

Filterpapiere und PVDF-Membran wurden auf die Größe des Gels zugeschnitten, in Puffer eingeweicht und in folgender Reihenfolge luftblasenfrei zwischen die Platten der Blottingapparatur geschichtet:

Kathode

5 Filterpapiere mit Kathodenpuffer getränkt

SDS-Polyacrylamidgel

PVDF-Membran kurz in Methanol, anschließend mit Anodenpuffer II getränkt

2 Filterpapiere mit Anodenpuffer II getränkt

3 Filterpapiere mit Anodenpuffer I getränkt

Anode

Der elektrische Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgte bei 0,8 mA/cm² für eine Stunde. Die getränkten Filterpapiere dienten hierbei als Ionenreservoirs und ermöglichten die Migration der Proteine.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran nach dem Blotten für eine Stunde in Blockinglösung (3 % Rinderserumalbumin (BSA) in 1x TBST) geschwenkt und anschließend dreimal in 1x TBST gewaschen. Um die Anwesenheit verschiedener Proteine parallel zu detektieren, wurde die Membran je nach Molekulargewicht des Proteins in Streifen geschnitten und diese Teilstücke bei 4°C über Nacht mit dem jeweiligen Primärantikörper (in 5 % BSA, 0,05 % NaN₃ in 1x TBST) auf dem Rotator inkubiert. Die verwendeten Antikörper und die entsprechenden Verdünnungen sind im Anhang zu finden.

Am folgenden Morgen folgte ein dreimaliger Waschschrift mit 1 % Milchpulver in 1x TBST und eine anschließende Inkubation im sekundären Antikörper für 60 Minuten bei 4°C. Der sekundäre Antikörper, der das Enzym Meerrettichperoxidase bindet, reagiert dabei mit der Fc-Region des primären Antikörpers. Um unspezifische Hintergrundfärbungen zu minimieren wurde die Membran zweimal 10 Minuten mit 1 % Milchpulver in 1x TBST und zweimal 5 Minuten mit 1x TBST gewaschen. Anschließend erfolgte die Detektion mit Hilfe des AmershamTM ECL SelectTM Western Blotting Detection Reagent. Dazu wurde die Membran in einem Gemisch aus Luminol-haltigem Reagenz A und Peroxid-haltigem Reagenz B inkubiert und die Lumineszenz mit der CCD-Kamera des Gerätes LAS400 Mini detektiert.

Das Prinzip dieser Chemilumineszenz-Reaktion beruht darauf, dass die an den sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase die Oxidation des Luminols katalysiert. Die in Folge dieser Reaktion entstehende Lichtemission ist proportional zur Proteinmenge.

Die Auswertung erfolgte mit der Multi Gauge 2.0 Software.

Tabelle 12. 10x TBS		
Tris Base	12,1	g
NaCl	87,5	g
H ₂ O bidest	ad 1000	ml

Tabelle 13. 1x TBST		
10x TBS	100	ml
Tween 20	1	ml
H ₂ O bidest	ad 1000	ml

2.7. RNA-Gewinnung und -Analyse

2.7.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus Mausgewebe.

Bei der Isolierung von Ribonukleinsäure (RNA) ist darauf zu achten, eine Kontamination mit den weit verbreiteten und außerordentlich stabilen RNasen, welche zum Abbau der RNA führen, zu vermeiden.

Aus diesem Grund wurde auf die Verwendung RNase-freier Verbrauchsmaterialien und Behältnisse geachtet, Arbeitsflächen mit RNase Zap® gereinigt und vorhandene RNasen mit dem reduzierenden Agent Guanidiniumisothiocyanat inaktiviert.

Das Gewebe wurde wie in 2.6.1. beschrieben präpariert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend unter Zugabe von 1 ml peqGOLD RNAPure™ pro 50 mg Gewebe mit dem T 10 basic ULTRA-TURRAX® homogenisiert. Um die Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten, erfolgte eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Danach wurden die Proben mit 0,2 ml Chloroform je eingesetztem Milliliter peqGOLD RNAPure™ versetzt und für 30 Sekunden kräftig geschüttelt. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte die Zentrifugation der Proben bei 12000 x g, um eine Phasentrennung zu erhalten. Die obere wässrige Phase enthält dabei die RNA, während DNA und Proteine in der Interphase und der unteren Phenolphase angereichert sind.

Die farblose RNA-haltige Phase wurde in ein neues Röhrchen überführt, zur Fällung der RNA mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt und 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Das bei der anschließenden Zentrifugation bei 12000 x g entstandene Zellpellet wurde zweimal mit 75 %igen Ethanol gewaschen, getrocknet und in sterilem RNase-freiem DEPC-Wasser gelöst.

Die Aufbewahrung erfolgte bei -80°C.

Tabelle 14. Herstellung von DEPC-Wasser

Diethylpyrocarbonat (DEPC)	1 ml
H ₂ O bidest	ad 1000 ml
über Nacht in bei 250°C gebackenem Gefäß rühren, autoklavieren	

2.7.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung wässriger Nukleinsäurelösungen erfolgte mit dem Nanodrop 2000 Spektralphotometer. Dieses Gerät misst die optische Dichte der Probenlösung bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Geräteausgabe erfolgt in ng/μl. Zudem wird die Reinheit der Nukleinsäurelösung über das Verhältnis $OD_{260/280}$ bestimmt. Liegt dieser Quotient im Sollbereich von 1,8 bis 2,0, so ist eine geringe Verunreinigung mit Proteinen gegeben.

2.7.3. DNA-Verdau

Um sicherzustellen, dass die isolierte Gesamt-RNA aus 2.7.1. nicht mit genomischer DNA verunreinigt ist, wurde ein DNA-Verdau durchgeführt. Die Desoxyribonuklease I und der zugehörige Reaktionspuffer stammten von der Firma Invitrogen.

2 μl 10x DNase I Reaction Buffer und 2 μl DNase I (1 U/μl) wurden zu 2 μg der eluierten Gesamt-RNA zugegeben, mit DEPC-Wasser auf 10 μl aufgefüllt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend fand unter Zusatz von 2 μl 25 mM EDTA-Lösung und Erhitzen auf 65°C für 10 Minuten im Thermocycler die Inaktivierung der DNase statt.

Die RNA-Proben wurden im Folgenden für die Synthese komplementärer DNA verwendet.

2.7.4. Reverse Transkription

Die reverse Transkription dient der Synthese einzelsträngiger komplementärer DNA (cDNA) aus Boten-RNA (mRNA). Es wurde 1 μg der von DNA gereinigten Gesamt-RNA mit 2 μl Oligo dT Primern (10 mM) versetzt, mit DEPC-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 12 μl aufgefüllt und 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine 5-minütige Inkubationsphase auf Eis, wobei sich die Primer an die Poly(A)⁺-Schwänze der Boten-RNA anlagerten. Ausgehend von dem Primer-RNA-Hybrid kam es nach Zugabe des Reaktionsmixes aus Tabelle 15 zur Synthese der komplementären DNA durch die Superscript II Reverse Transkriptase. Nach 60-minütiger Inkubation bei 42°C wurde das Enzym durch Erhitzen auf 70°C für 10 Minuten inaktiviert. Die erhaltene cDNA diente als Ausgangsmaterial für die quantitative PCR und wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Tabelle 15. Reaktionsmix für einen Ansatz		
5x First Strand Puffer	4	µl
DTT (0,1 M)	2	µl
dNTPs (10 mM)	1	µl
RNase Inhibitor	0,1	µl
Superscript II Reverse Transkriptase	1	µl

2.7.5. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Die real-time PCR beruht auf dem Amplifikationsprinzip der klassischen PCR, ermöglicht jedoch zusätzlich eine Quantifizierung der gewonnenen DNA-Produkte mittels Fluoreszenzmessungen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde SYBR Green I als Farbstoff verwendet. Dieser lagert sich zwischen die doppelsträngige DNA ein, wodurch die Fluoreszenz proportional zur Menge der PCR-Produkte zunimmt.

An DNA gebundenes SYBR Green I fluoresziert wesentlich stärker als freies SYBR Green I.

Die Messung erfolgte mit Hilfe des StepONE Plus Cyclyer am Ende jedes Elongationsschrittes im Vergleich zu einem Referenzfarbstoff (ROX). Es wurde der Ct-Wert, die Zyklenzahl, die zur Überschreitung des Referenzsignals/Grundsignals nötig ist, ermittelt. Das unabhängig exprimierte Haushaltsgen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) diente als interne Kontrolle und wurde für jede Probe zusätzlich bestimmt. Die Reaktionen wurden in Dupletten durchgeführt und aus den Ct-Werten der Mittelwert errechnet. Die Gruppen an Mäusen, die Futter ohne Esomeprazol (-PPI) oder PPI und Kochsalzlösung-Injektionen (-PPI; +NaCl-Inj.) erhielten, dienten als Referenzgruppen. Die Spezifität der Primer wurde durch eine Schmelzkurvenanalyse bestätigt.

Reaktionsmix und PCR-Protokoll sind in Tabelle 16 und Tabelle 17 gezeigt.

Tabelle 16. Reaktionsmix qRT-PCR		
FastStart Universal SYBR Green Master Rox	6,25	µl
Forward Primer (20 pmol/µl)	0,25	µl
Reverse Primer (20 pmol/µl)	0,25	µl
cDNA	100	ng
H ₂ O _{bidest.}	ad 12,5	µl

Tabelle 17. PCR-Protokoll qRT-PCR		
	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95°C	10 min
Denaturierung	95°C	15 sec
Hybridisierung	60°C	60 sec
Elongation	65°C	90 sec

} x 40

Die Auswertung erfolgte durch die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode (Livak and Schmittgen, 2001).

Dabei wurde der ΔCt -Wert einer Probe aus der der Differenz des Zielgens und des Haushaltsgens GAPDH ermittelt (1) und der ΔCt -Wert der Referenzgruppe (-PPI oder -PPI; +NaCl-Inj.) aus der Differenz der Ct-Mittelwerte (Ct-MW) des Zielgens und GAPDH errechnet (2), sodass sich für $\Delta\Delta Ct$ Gleichung (3) ergab.

$$(1) \Delta Ct_{\text{Probe}} = [Ct_{\text{Probe}} (\text{Zielgen}) - Ct_{\text{Probe}} (\text{GAPDH})]$$

$$(2) \Delta Ct_{\text{Referenzgruppe}} = [MW - Ct_{\text{Referenzgruppe}} (\text{Zielgen}) - MW - Ct_{\text{Referenzgruppe}} (\text{GAPDH})]$$

$$(3) \Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Probe}} - \Delta Ct_{\text{Referenzgruppe}}$$

Das Expressionsverhältnis wurde schließlich wie folgt errechnet:

$$(4) r = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Dieser Wert gibt die relative Veränderung der Genexpression einer Probe im Vergleich zur Referenzgruppe wieder.

2.8. Histologische Untersuchungen

2.8.1. Anfertigen von Paraffinschnitten

Das entnommene Gewebe wurde in PBS gewaschen und anschließend mit 4 % Paraformaldehyd in PBS über Nacht bei 4°C fixiert. Am nächsten Morgen wurden die Organe dreimal für 20 Minuten in PBS gespült und über eine aufsteigende Ethanolreihe (50 %, 70 %, 90 %, 95 % und 100 %), Ethanol/Toluol 1:1 und anschließend 100 % Toluol für jeweils eine Stunde bei Raumtemperatur dehydriert. Es folgte eine Inkubationsphase in Paraplast® I-III bei 60°C, wobei das Gewebe in Paraplast® I über Nacht und in Paraplast® II und III für jeweils 2 bis

4 Stunden verweilte. Schließlich wurden die Organe in entsprechenden Formen in frisches flüssiges Paraplast® eingebettet. Nach dem Aushärten des Paraffins auf Eis wurden mittels eines Rotationsmikrotoms 10 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt, diese in einem 37°C-warmen Wasserbad geglättet und auf polylysinbeschichtete Objektträger aufgezogen. Das Trocknen erfolgte über Nacht bei 37°C im Trockenschrank.

Vor der Durchführung der Färbung wurden die Schnitte 3x 10 Minuten in Toluol entparaffinisiert, jeweils 5 Minuten in einer absteigenden Ethanolreihe (2x 100 %, 90 %, 70 %, 50 %) rehydriert und anschließend mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gespült.

2.8.2. Berliner Blau-Färbung

Die Berliner Blau-Färbung dient dem Nachweis von dreiwertigem Eisen. Das durch Salzsäure gelöste Eisen reagiert dabei mit Kaliumhexacyanoferrat (II) zu folgendem Komplex: $\text{K}[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]$ bzw. $\text{Fe}^{\text{III}}[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]_3$. Dieser wird aufgrund seiner strahlenden blauen Farbe Berliner Blau oder Preußisches Blau genannt.

Nach der Entparaffinisierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte wurden die Objektträger für 5 Minuten in 10 % (g/100 ml) Kaliumhexacyanoferrat in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ getaucht und anschließend 30 Minuten in 5 % (g/100 ml) Kaliumhexacyanoferrat (in 3,7 %iger Salzsäure) inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ und eine anschließende Rotfärbung der Zellkerne mit Safranin O (0,6 % (g/100 ml) in 66 % Ethanol). Danach wurden die Objektgläser mit DePex-Harz eingedeckelt.

2.9. Eiseninjektionen

Den Mäusen wurde jeden zweiten Tag intraperitoneal Venofer® (Eisen-(III)-hydroxid-Saccharose-Komplex) injiziert, welches mit 0,9 %iger Kochsalzlösung verdünnt wurde. Es erfolgten in Summe 6 Injektionen (Tag 1, 3, 5, 7, 9, 11), wobei pro Injektion eine Menge von 0,8 mg Fe^{3+} verabreicht wurde. Die Kontrollgruppe wurde nach gleichem Schema mit derselben Menge reiner Kochsalzlösung versetzt. Die Blutentnahme erfolgte an Tag 13 oder Tag 29 wie in 2.10. beschrieben.

2.10. Blutentnahme und Blutwertbestimmung

Den Mäusen wurden zunächst intraperitoneal 200 Internationale Einheiten (I.E.) Heparin-Natrium injiziert. Nach circa 10 Minuten wurden die Tiere mit Isofluran anästhesiert, durch zervikale Dislokation euthanasiert und über ihre Läufe auf dem Rücken fixiert. Nach Desinfektion mit Ethanol, wurde die Brusthaut mittig aufgeschnitten, der Brustkorb geöffnet und somit das Herz freigelegt. Anschließend erfolgte die Blutentnahme durch Punktion des Herzens. 50 µl Blut wurden in einer mit EDTA (Ethyldiamintetraacetat)-beschichteten Kapillarpipette aufgefangen und anschließend in ein Probenröhrchen – gefüllt mit 200 µl Verdünnungslösung CELLPACK – überführt. Die Proben wurden unter Kühlung zur deutschen Mauslinik des Helmholtz Zentrums München gebracht und dort mit dem Sysmex XT2000iV Hämatologieautomaten vermessen.

2.11. Eisenmessung

Heparinisierung, Euthanisierung und Blutentnahme erfolgten wie in 2.10. beschrieben. Als Auffangbehältnis dienten Lithium-Heparin beschichtete 200 µl Microvetten®. Die Blutproben wurden innerhalb von 15 Minuten nach Entnahme für 5 Minuten bei 2000 x g zentrifugiert und der Überstand anschließend für die Eisenbestimmung verwendet. Zur Bestimmung des Gesamteisengehalts im Plasma wurde das QuantiChrom™ Iron Assay Kit von BioAssay Systems verwendet. Der Test beruht darauf, dass Ascorbinsäure Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduziert, welches mit dem zugegebenen Chromogen einen blauen Komplex bildet, der photometrisch vermessen werden kann.

Zunächst wurden Standardverdünnungen von 200 µg/dl Fe^{2+} und 400 µg/dl Fe^{2+} und das Arbeitsreagenz bestehend aus Reagenz A (Puffer), B (Ascorbinsäure) und C (Chromogen) im Verhältnis 20:1:1 hergestellt.

Anschließend wurden für eine Probe 4 Ansätze gemäß Tabelle 17 in je eine Vertiefung einer 96-Well-Platte pipettiert, 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann bei 560 nm mit dem Multiskan™ FC Photometer vermessen.

Es folgte die Erstellung einer Geradengleichung für jede Probe, wobei die Absorptionswerte von Ansatz B, C und D nach Abzug des Blindwertes A einer Konzentration von 0, 200 und 400

$\mu\text{g/dL Fe}^{2+}$ entsprachen. Der Schnittpunkt der Geraden mit der x-Achse stellte die gesuchte Gesamteisen-Konzentration in der jeweiligen Plasma-Probe dar.

Tabelle 17. Reaktionansätze für eine Plasma-Probe		
Ansatz	Zusammensetzung	
A	Plasma-Probe	25 μl
	H ₂ O _{bidest.}	50 μl
	Reagenz A	200 μl
B	Plasma-Probe	25 μl
	H ₂ O _{bidest.}	50 μl
	Arbeitsreagenz	200 μl
C	Plasma-Probe	25 μl
	Standard 1 (200 $\mu\text{g/dL}$)	50 μl
	Arbeitsreagenz	200 μl
D	Plasma-Probe	25 μl
	Standard 2 (400 $\mu\text{g/dL}$)	50 μl
	Arbeitsreagenz	200 μl

2.12. Interleukin-6 (IL-6) ELISA

Die quantitative Bestimmung von Interleukin-6 im Maus-Serum erfolgte unter Verwendung des Mouse IL-6 Immunoassay Quantikine® ELISA Kit von R&D Systems. Die Blutproben wurden einer euthanasierten Maus durch Herzpunktion entnommen und nach der vom Hersteller empfohlenen Ausgerinnungszeit von 2 Stunden für 20 Minuten bei 2000 x g zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und in ein neues Probengefäß überführt.

Bei dem verwendeten ELISA handelt es sich um einen Enzym-gekoppelten Antikörper-Antigen-Antikörper-Immunassay. Nach Zugabe von 50 μl Assay Diluent RD1-24 wurden je 50 μl Serum-Probe, Kontrolle, IL-6-Standard und Blindwert in die mit Antikörper beschichteten Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Während der 2-stündigen Inkubationsphase

konnte vorhandenes IL-6 an den festen Antikörper binden. Ungebundenes Material wurde durch einen 5-fachen Waschschrift mit dem im Kit enthaltenen Puffer entfernt. Anschließend wurden 100 µl jenes Reagenzes zugegeben, welches mit Meerrettichperoxidase konjugierten polyklonalen Antikörper gegen murines IL-6 enthält. Dieser bindet an das IL-6-Antigen, sodass es zur Ausbildung eines Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexes kommt. Nach 2 Stunden wurde freier Antikörper abgewaschen und 100 µl der chromogenen Enzymsubstrat-Lösung zugegeben. Die gekoppelte Meerrettichperoxidase führt zur Bildung eines blauen Produktes, welches durch Zugabe einer Salzsäure-haltigen Stopplösung nach 30 Minuten gelb wird. Die Farbintensität ist proportional zur Menge an IL-6, welche im ersten Schritt an den Antikörper gebunden wurde. Die photometrische Messung erfolgte mit dem Multiskan™ FC bei einer Wellenlänge von 450 nm. Um Unregelmäßigkeiten der Platte zu korrigieren, wurde eine Wellenlängenkorrektur bei 560 nm durchgeführt. Nach Subtraktion des Blindwertes wurde die Eichgerade ermittelt, indem die Absorptionswerte der IL-6-Standardlösungen (Ordinate) logarithmisch gegen die Konzentrationen (Abszisse) aufgetragen wurden. Die mit GraphPad Prism 5 bestimmte Geradengleichung diente zur Errechnung der gesuchten IL-6-Konzentrationen der Proben.

2.13. Isolation TER-119-positiver Zellen

Die Isolation TER-119-positiver Zellen aus dem Maus-Plasma erfolgte mit dem CELlection™ Biotin Binder Kit (Invitrogen) und dem biotinylierten Anti-Maus-TER-119-Antikörper (R&D Systems). Die verwendeten Dynabeads® sind uniforme, superparamagnetische, monodisperse Polystyren-Partikel mit einem Durchmesser von 4,5 µm, welche über einen DNA-Linker mit Streptavidin beschichtet sind. Dieser DNA-Linker verfügt über einen Spaltbereich für DNase I, so dass die Beads nach der Zellisolation entfernt werden können. Die hohe Affinität zwischen Streptavidin und Biotin erlaubt eine schnelle und effiziente Isolierung von biotinmarkierten Molekülen.

Die Plasma-Proben (Blutentnahme siehe 2.10.) wurden vor Gebrauch mit dem doppelten Volumen an Puffer 2 (siehe Tabelle 19) versetzt, 10 Minuten bei 600 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen. Nach Resuspension der Zellen in Puffer 2 erfolgte die Zugabe von 10 µg des biotinylierten TER-119-Antikörpers und eine Inkubationsphase von 10 Minuten bei 4°C, wobei die erythroiden Zellen (Retikulozyten und Erythrozyten) an den Antikörper binden

konnten. In der Zwischenzeit wurden 25 µl der Dynabeadslösung mit Puffer 1 (siehe Tabelle 18) gewaschen und in Folge der Antikörper-Zell-Suspension zugesetzt. Nach 20-minütiger Inkubation bei 4°C wurden die Dynabeads und die daran gebundenen TER-119-positiven Zellen mit dem DynaMag™-5 Magnet an der Probenröhrchenwand fixiert, der ungewünschte Überstand abpipettiert und 1 ml Puffer 1 zu den Beads zugegeben. Der Waschschrift wurde 3-mal wiederholt und der Dynabead-Antikörper-Zell-Komplex anschließend in 200 µl 37°C-warmem PBS resuspendiert. Es erfolgte die Zugabe von 4 µl DNase I-haltigem Releasing-Puffer, wodurch die Zellen von den Beads befreit werden konnten. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur und sanftem Auf- und Abpipettieren wurde das Probenröhrchen in den Magneten gestellt und der Überstand mit den gewünschten Zellen in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde bei 13000 x g zentrifugiert, das entstandene Zellpellet mit 30 µl 2 % SDS/50 mM Tris (pH 7,4) versetzt und 10 min bei 95°C gekocht. Es wurde eine Konzentrationsbestimmung wie in 2.6.2. beschrieben und eine SDS-PAGE-Auftrennung mit anschließendem Western Blot gemäß 2.6.3. und 2.6.4. durchgeführt.

Tabelle 18. Puffer 1

PBS (Ca ²⁺ - und Mg ²⁺ -frei) 0,1 % bovines Serumalbumin pH 7,4

Tabelle 19. Puffer 2

PBS (Ca ²⁺ - und Mg ²⁺ -frei) 0,1 % bovines Serumalbumin 2 mM EDTA
--

2.14. Haemocult® Test

Der Haemocult®- Test dient dem Nachweis von okkultem Blut im Stuhl und ist ein möglicher Hinweis für eine Erkrankung des Verdauungstraktes. Der Test beruht darauf, dass ein mit Guajak-Harz imprägniertes Filterpapier mit Wasserstoffperoxidlösung versetzt wird, wobei in Anwesenheit von Blut ein blaugefärbtes Oxidationsprodukt entsteht. Das im Hämoglobin enthaltene Häm wirkt dabei als Katalysator für die Reaktion und bewirkt einen Farbumschlag innerhalb weniger Sekunden.

Um den Stuhl zu sammeln, wurde jedes Tier für 2 Stunden in einem separaten Käfig gehalten. Die Fäkalien der Maus wurden auf 3 Testbriefe aufgebracht, für 48 Stunden getrocknet und anschließend auf der Rückseite mit Wasserstoffperoxidlösung betropft. Der Test wurde als positiv gewertet, wenn einer der drei Testbriefe eine Blaufärbung zeigte.

2.15. Statistische Auswertung

Sind mehrere Ergebnisse zusammengefasst, so werden diese stets als Mittelwerte \pm Standardabweichungen der Mittelwerte (SEM) angegeben. Die Berechnung der statistischen Signifikanz der Daten erfolgte mit der Software GraphPad Prism 5 unter Verwendung des One Way ANOVA und Bonferroni Post-Hoc-Tests. Die Signifikanzniveaus sind dargestellt als * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) und *** ($p < 0,001$).

3. Ergebnisse

3.1. Einfluss von Protonenpumpenhemmern (PPIs) auf die Lebensdauer cGKI-defizienter Mäuse

cGKI-defiziente Mäuse haben eine stark verminderte Lebenserwartung. Mehr als 50 % der Tiere sterben innerhalb der ersten 5 Wochen nach der Geburt (siehe Abbildung 7). Die Ursachen hierfür können vielfältig sein. So wurde unter anderem gezeigt, dass cGKI-Knockout (cGKI KO)-Mäuse und cGKI β -Rescue (β -Res.)-Mäuse, welche die cGKI β -Isoform ausschließlich im glatten Muskel exprimieren, ein blutendes duodenales Ulcus entwickeln. Das Geschwür ist bedingt durch das Fehlen der cGKI in Neuronen und der damit einhergehenden verminderten Protonen-induzierten Bikarbonatsekretion, einem wichtigen Schutzmechanismus des Duodenums vor der aggressiven Magensäure. Die Verabreichung des Protonenpumpenhemmers (PPI) Esomeprazol, welcher in Form von MUPS® („multiple unit pellet systems“) ins Futtermittel verpresst wurde (8 mg/kg Futtermittel), führte zu einer deutlichen Erhöhung der Lebensdauer bei cGKI KO-Mäusen (Singh et al., 2012).

PPIs reduzieren die Magensäuresekretion, indem sie die Protonenpumpe H⁺/K⁺-ATPase in den Parietalzellen des Magens irreversibel inaktivieren.

Abbildung 7 zeigt die Überlebenskurve von cGKI KO-Mäusen ohne (Anzahl n=12) und mit (n=23) PPI-Behandlung im Vergleich zu Kontrolltieren (n=42), welche ebenfalls mit Esomeprazol versetztes Futtermittel erhielten. 9 Wochen nach der Geburt waren alle cGKI KO-Mäuse mit normaler Fütterung verstorben, wohingegen zu diesem Zeitpunkt noch über 50 % der cGKI KO-Mäuse mit PPI Gabe am Leben waren. Die ersten Wochen erwiesen sich bei der Gruppe „cGKI KO + PPI“ jedoch als kritisch, etwa 40 % der Tiere verstarben bis zur fünften Woche. Am Ende des Beobachtungszeitraums von 37 Woche waren noch 34 % (8 von 23) der cGKI KO-Mäuse und 93 % (39 von 42) der Kontrolltiere mit PPI-Behandlung am Leben.

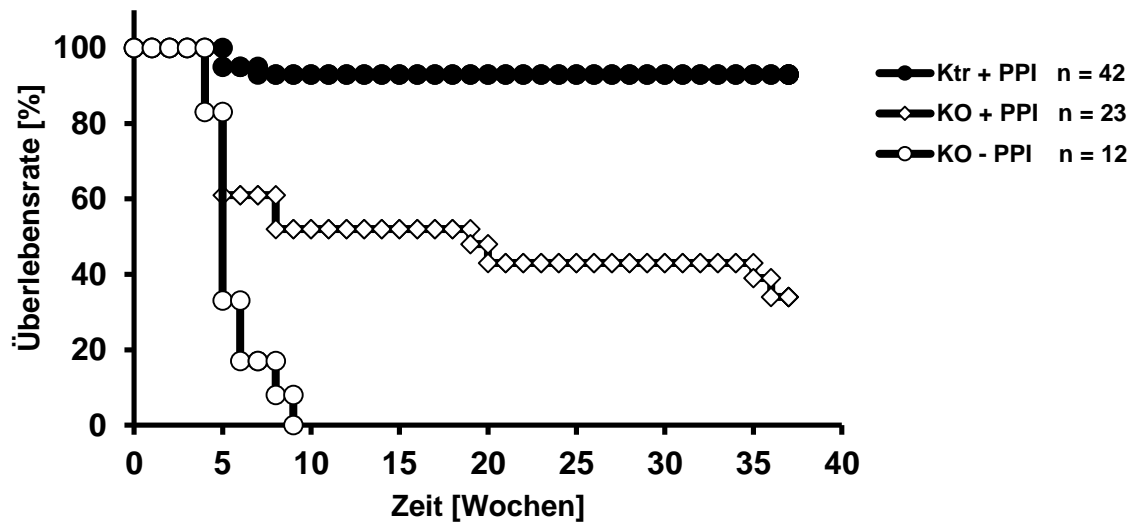


Abbildung 7: Kaplan-Meier-Überlebenskurve.

Kontrolltiere (Ktr) (Anzahl n=42) und cGKI KO-Mäuse (KO) erhielten Futtermittel ohne (-PPI) (n=12) und mit (+PPI) (n=23) Protonenpumpenhemmer (PPI) (8 mg Esomeprazol/kg Futter), (Singh et al., 2012).

3.2. Beeinflussung der intestinalen Blutung durch PPIs

Um zu beurteilen, ob die erhöhte Lebenserwartung der cGKI KO-Mäuse bei Behandlung mit PPIs mit einer Verminderung des Blutverlustes durch das blutende duodenale Ulcus einhergeht, wurde ein Haemocult®-Test durchgeführt. Die Fäkalien von cGKI KO-, β -Rescue- und Wildtyp (WT)-Mäusen ohne (-PPI) und mit (+PPI) Protonenpumpenhemmer-Behandlung wurden auf okkultes Blut untersucht. Ist im Folgenden von PPI-Gabe die Rede, so bezieht sich dies auf Futtermittel, welches 18 mg Esomeprazol in Form von MUPS® enthält und von Geburt an die Jungtiere und das jeweilige Muttertier verfüttert wurde. Durch die Erhöhung der PPI-Menge sollte eine ausreichende Aufnahme des Wirkstoffes erreicht und die Sterberate reduziert werden. Wie Abbildung 8 zeigt, hatten bei normaler Fütterung 9 der 10 cGKI KO-Mäuse und 13 der 15 β -Rescue-Mäuse Blut im Stuhl. Bei den WT-Mäusen war lediglich eines der 50 Tiere Haemocult®-positiv. Erhielten die Tiere die Esomeprazol-haltige Spezialdiät, so wurde bzw. wurden lediglich eine der 13 KO-Mäuse, zwei der 10 β -Rescue- und keine der WT-Mäuse positiv getestet. Die Behandlung der Tiere mit PPI stoppte folglich die intestinale Blutung bei dem Großteil der cGKI-defizienten Mäuse, sodass kein Blut mehr im Stuhl nachweisbar war.

Ergebnisse

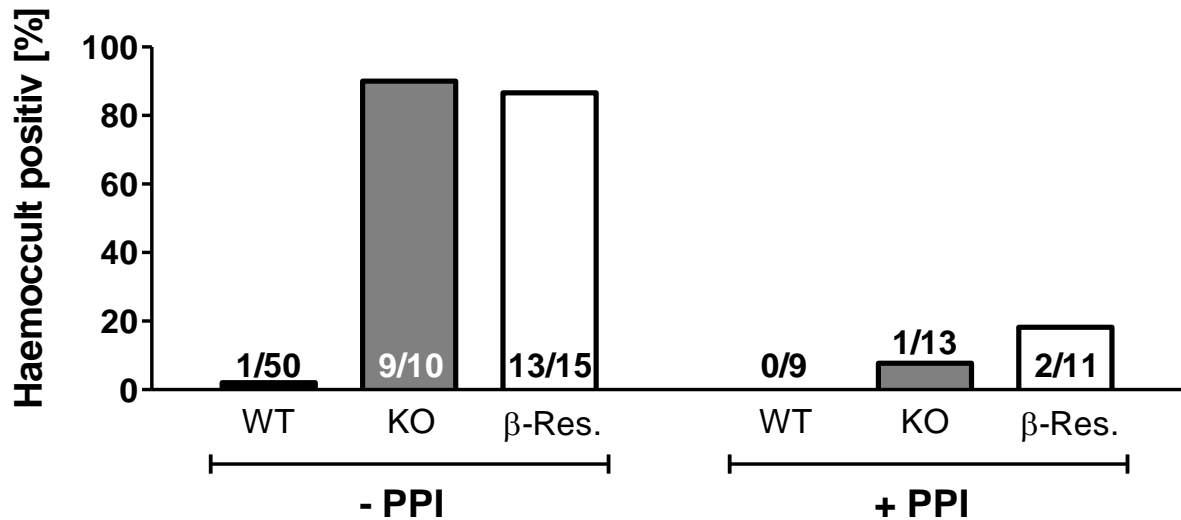


Abbildung 8: Intestinale Blutung.

Die Fäkalien von 4-12 Wochen alten Wildtyp (WT)-, cGKI KO (KO)- und β -Rescue (β -Res.)-Mäusen wurden mit Hilfe des Haemoccult® Test auf Blut getestet. In der linken Spalte erhielten die Tiere normales (-PPI), in der rechten mit Esomeprazol versetztes Futter (+PPI) (18 mg/kg Futter). Die Nummern in den Säulen geben die Anzahl der positiv getesteten Tiere an.

3.3. Untersuchung der Blutwerte

Es wurde bereits gezeigt, dass cGKI-defiziente Mäuse eine Anämie, eine Verminderung der Hämoglobin-Konzentration im Blut, aufweisen (Foller et al., 2008).

Das Blut der Tiere wurde erneut unter Verwendung des Sysmex XT2000iV Hämatologieautomaten der deutschen Mauslinik des Helmholtz Zentrums München untersucht. Die Blutentnahme erfolgte durch Punktion des Herzens von zuvor heparinisierten und euthanisierten Mäusen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt. Die Hämoglobin-Werte der cGKI KO-Mäuse waren mit $11,66 \pm 0,68$ g/dl und $12,14 \pm 0,56$ g/dl bei β -Res.-Mäusen deutlich niedriger als jene der WT-Tiere ($17,28 \pm 0,22$ g/dl). Zudem war die Anzahl der roten Blutzellen (Abb. 9 A) der cGKI KO ($6,93 \pm 0,45 \cdot 10^6/\mu\text{l}$)- und cGKI β -Res. ($7,37 \pm 0,34 \cdot 10^6/\mu\text{l}$)-Mäuse im Vergleich zu den WT-Kontrolltieren ($10,88 \pm 0,16 \cdot 10^6/\mu\text{l}$) hochsignifikant reduziert. Für die cGKI-defizienten Mäuse ergab sich somit ein stark verminderter Hämatokrit-Wert (Abb. 9 C). Dieser stellt den prozentualen Anteil der hauptsächlich aus Erythrozyten bestehenden Zellbestandteile am Blutvolumen dar. Die Bemühung des Organismus den Verlust an roten Blutzellen und den dadurch bedingten Sauerstoffmangel zu kompensieren, zeigt sich durch die erhöhte Erythropoetin-Konzentration (nicht gezeigt) und Retikulozytenzahl (Abb. 9 D) im Blut von cGKI-defizienten Mäusen. Bei Retikulozyten handelt

es sich um die unmittelbare Vorstufe der reifen Erythrozyten und ihr Anteil im Blut gibt Aufschluss über die Knochenmarkfunktion und -leistung im Rahmen der Erythropoese (Lohr and Keppler, 2005).

Retikulozyten enthalten noch Reste von Ribonukleinsäure (RNA) im Plasma, welche mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes angefärbt werden können und somit die Unterscheidung zu reifen Erythrozyten ermöglichen. Da der RNA-Gehalt der Retikulozyten mit zunehmender Reife der Zelle abnimmt, ist zudem eine Einteilung in verschiedene Reifestadien durchführbar (Lohr and Keppler, 2005; Sysmex, 2007).

Bei den cGKI KO-Mäusen war die absolute Retikulozytenzahl mit $1,57 \pm 0,21 \cdot 10^6/\mu\text{l}$ und $1,56 \pm 0,17 \cdot 10^6/\mu\text{l}$ bei β -Res.-Mäusen im Vergleich zu $0,37 \pm 0,01 \cdot 10^6/\mu\text{l}$ bei WT-Tieren extrem erhöht. Dies entspricht einem Anteil von 22,7 % (KO) bzw. 21,2 % (β -Res.) an den gesamten roten Blutzellen (Retikulozyten + reife Erythrozyten), wohingegen es bei den Kontrolltieren lediglich 3,4 % waren. Eine genauere Analyse zeigte zudem einen hohen Anteil unreifer, RNA-reicher Retikulozyten (nicht gezeigt). Die erhöhte absolute Zahl und der geringe Reifegrad der Retikulozyten stellen eine adäquate erythroide Antwort der cGKI-defizienten Mäuse auf die Anämie dar (Chang and Kass, 1997). Die mutierten Tiere wiesen außerdem ein hohes mittleres zelluläres Erythrozyten-Volumen (MCV) (siehe Abb. 9 E) und eine erhöhte Erythrozytenverteilungsbreite (RDW) (siehe Abb. 9 F) auf. Beide Werte wurden aus der Gesamtheit roter Blutzellen ermittelt, wobei Retikulozyten größer sind als Erythrozyten. Folglich ergaben sich bei cGKI-defizienten Mäusen aufgrund des gesteigerten Retikulozytenanteils sehr hohe MCV- und RDW-Werte.

Ergebnisse

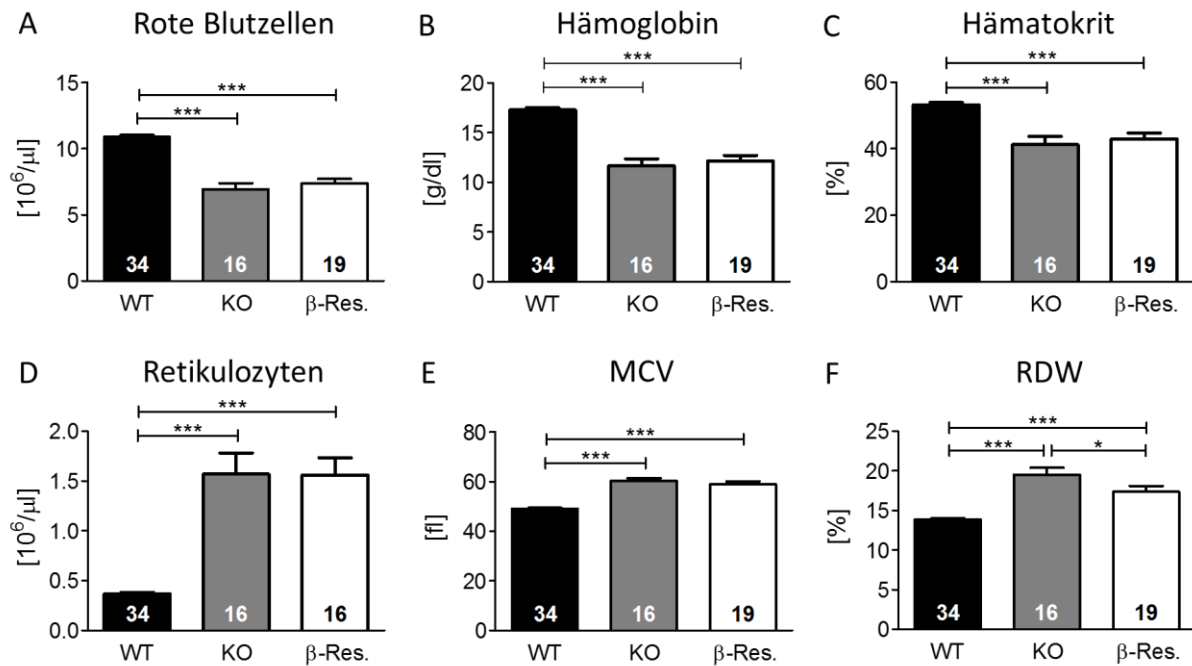


Abbildung 9: Blutparameter.

Das Blut der 6-12 Wochen alten WT-, cGKI KO- und β -Res.-Mäuse wurde auf A) die Anzahl roter Blutzellen, B) die Hämoglobin-Konzentration, C) den Hämatokrit-Wert, D) die Retikulozytenzahl, E) das mittlere zelluläre Erythrozyten-Volumen (MCV) und F) die Erythrozytenverteilungsbreite (RDW) untersucht. Die Anzahl der Mäuse ist in den Säulen gegeben. ***, $P < 0,001$; *, $P < 0,05$.

3.3.1. Einfluss von Eiseninjektionen auf das Blutbild

Da Eisenmangel der häufigste Grund für eine Anämie ist, wurde den Mäusen parenteral ein Eisen-(III)-hydroxid-Saccharose-Komplex (Venofer®) verabreicht. Es erfolgten sechs intraperitoneale (i.p.) Injektionen mit je 0,8 mg Fe^{3+} , welche jeden zweiten Tag durchgeführt wurden (Tag 1, 3, 5, 7, 9, 11). Mäuse mit Kochsalzlösung (NaCl)-Injektionen dienten als Kontrollgruppe. An Tag 13 wurde Blut entnommen und ein großes Blutbild angefertigt. Da die Blutparameter keine Unterschiede zur Kontrollgruppe zeigten, wurde eine neue Versuchsreihe mit einer Blutentnahme an Tag 29 durchgeführt. Die Ergebnisse hierzu zeigt Abbildung 10. Auch zu späterem Zeitpunkt war kein signifikanter Unterschied zwischen Mäusen mit Eisen-Injektionen und Kontrollmäusen mit NaCl-Injektionen in Bezug auf rote Blutzellen, Hämoglobin-Konzentration, Hämatokrit-Wert und Retikulozytenzahl (Abb. 10 A-D) zu erkennen. Die MCV- und RDW-Werte der Mausmutanten mit Eisenbehandlung waren ebenfalls noch erhöht (nicht gezeigt).

Ergebnisse

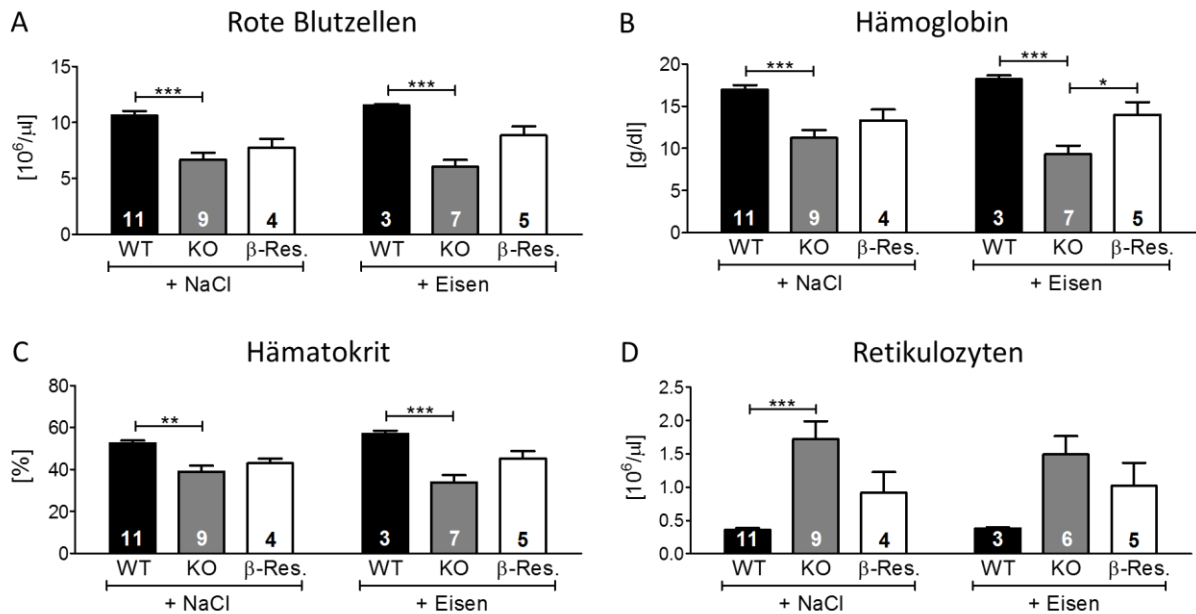


Abbildung 10: Einfluss von Eiseninjektionen auf die Blutparameter.

Das Blut der 8-13 Wochen alten WT-, cGKI KO- und β-Res.-Mäuse wurde auf A) die Anzahl roter Blutzellen, B) die Hämoglobin-Konzentration, C) den Hämatokrit-Wert und D) die Retikulozytenzahl untersucht. In der linken Spalte wurde den Tieren Kochsalzlösung (+NaCl), in der rechten Eisen (+Eisen) in Form eines Eisen-(III)-hydroxid-Saccharose-Komplexes (6x 0,8 mg Fe³⁺) i.p. injiziert. Die Anzahl der Mäuse ist in den Säulen gegeben. ***, $P < 0,001$; **, $P < 0,01$; *, $P < 0,05$.

Die Anämie der cGKI KO- und der β-Res.-Mäuse kann nicht durch alleinige Behandlung mit Eisen in Form von intraperitonealen Injektionen geheilt werden.

3.3.2. Einfluss von PPI-Gabe auf das Blutbild

Da cGKI-defiziente Mäuse ein blutendes Ulcus im Duodenum entwickeln und die Blutung durch die PPI-Behandlung vermieden werden konnte (siehe 3.2.), wurde der Einfluss von Protonenpumpenhemmer-Fütterung (18 mg Esomeprazol/kg Futter) auf das Blutbild analysiert. Abbildung 11 vergleicht die Blutwerte von WT-, cGKI KO- und β-Res.-Mäusen ohne (linke Spalte) und mit (rechte Spalte) PPI-Behandlung. cGKI-mutierte Mäuse, welche von Geburt an PPI-haltiges Futter erhielten, weisen im Vergleich zu Tieren mit normaler Fütterung eine hochsignifikant höhere Anzahl roter Blutzellen (Abb. 11 A), höhere Hämoglobin (Abb. 11 B)-, und Hämatokrit-Werte (Abb. 11 C), eine verminderte Retikulozytenzahl (Abb. 11 D) und reduzierte MCV (Abb. 11 E)- und RDW-Werte auf (Abb. 11 F).

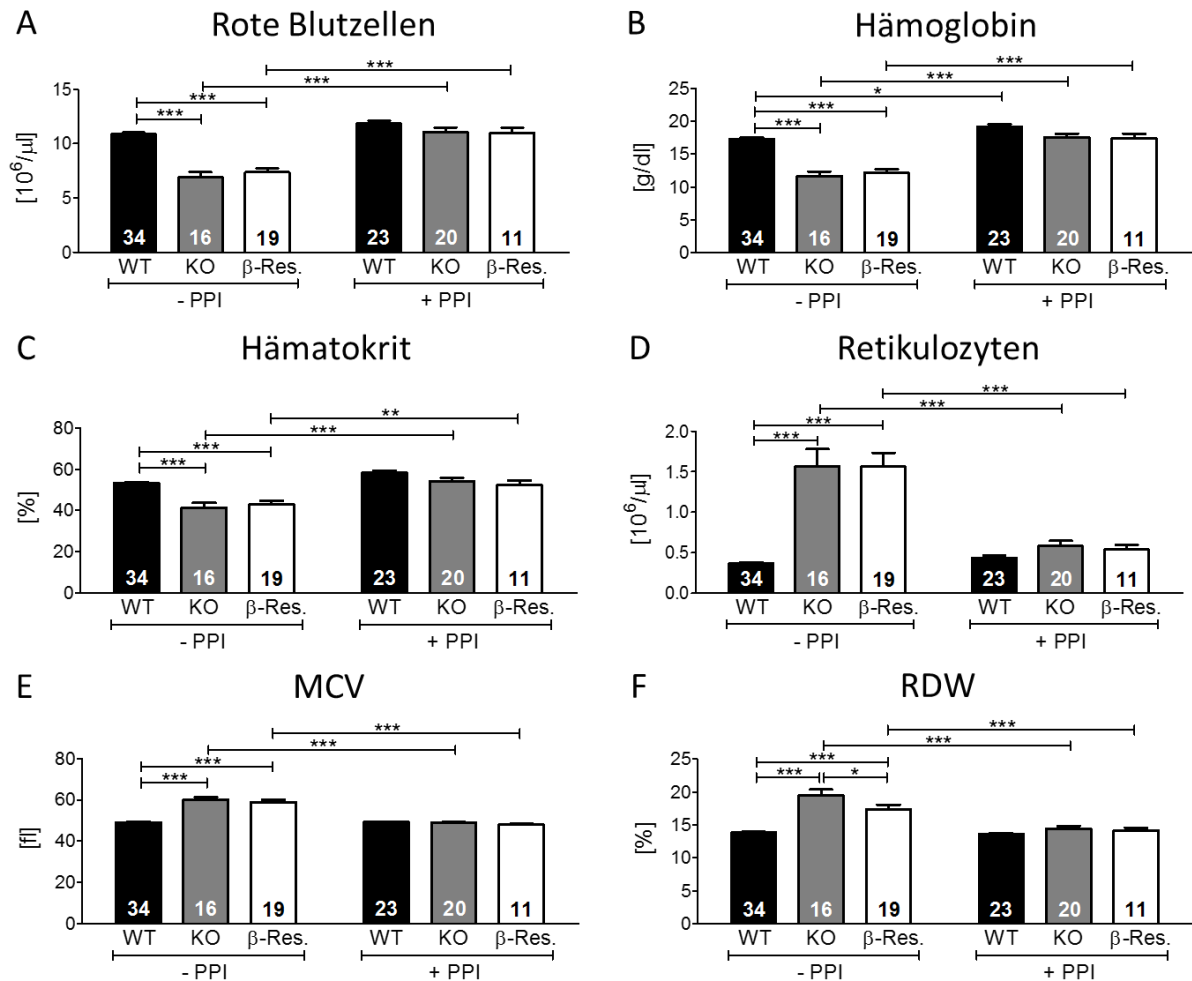


Abbildung 11: Einfluss von PPI auf die Blutparameter.

Das Blut der 8-13 Wochen alten WT-, cGKI KO- und β-Res-Mäuse wurde auf A) die Anzahl roter Blutzellen, B) die Hämoglobin-Konzentration, C) den Hämatokrit-Wert und D) die Retikulozytenzahl, E) das mittlere zelluläre Erythrozyten-Volumen (MCV) und F) die Erythrozytenverteilungsbreite (RDW) untersucht. Die linke Spalte eines Graphen zeigt Tiere ohne (-PPI), die rechte Spalte Mäuse mit (+PPI) PPI-Behandlung (18 mg Esomeprazol/kg Futter). Die Anzahl der Mäuse ist in den Säulen gegeben. ***, $P < 0,001$; **, $P < 0,01$; *, $P < 0,05$.

Durch die Gabe von PPIs konnten die genannten Parameter normalisiert werden (siehe Abb. 11 A-F, rechte Spalte), die Anämie wurde vermieden.

3.4. Splenomegalie

Die Milz spielt eine wichtige Rolle bei der Wiederverwertung alter roter Blutzellen. Alte, geschädigte oder veränderte Erythrozyten werden von den retikuloendothelialen Makrophagen der Milz phagozytiert und degradiert. Das dabei frei werdende Eisen kann abermals für die Synthese neuer roter Blutzellen verwendet werden (Ganz, 2013).

Ergebnisse

Es wurde beobachtet, dass cGKI-defiziente Mäuse eine Splenomegalie, eine Vergrößerung der Milz (siehe Abb. 12 linke Spalte) und gemäß histologischen Inspektionen eine erhöhte Anzahl erythroider Zellen in diesem Organ aufweisen (nicht gezeigt). Föller et al. beschreibt die Splenomegalie als eine Folgeerscheinung der Anämie, welche erst einige Wochen nach der Blutarmut auftritt. Aus diesem Grund wurde getestet, ob die PPI-Gabe und folgende Vermeidung der Anämie auch Auswirkungen auf die Milzgröße hat.

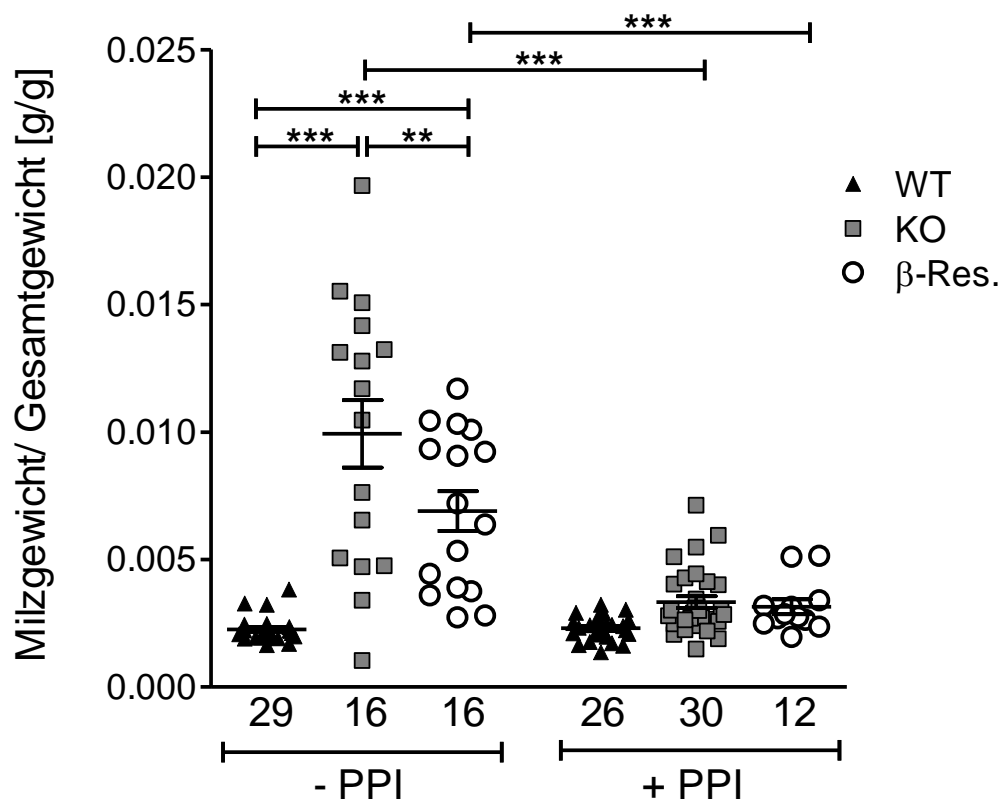


Abbildung 12: Milzgewicht im Verhältnis zum Gesamtgewicht.

Das Milzgewicht von cGKI KO-Mäusen im Alter von 6-19 Wochen, 6-13 Wochen alten β-Res.- und 6-22 Wochen alten WT-Tieren ohne (-PPI) und mit (+PPI) PPI-Behandlung (18 mg/kg Futter) wurde im Verhältnis zum Gesamtkörpergewicht bestimmt. Die Mauszahlen sind unter der x-Achse gegeben. ***, $P < 0,001$; **, $P < 0,01$.

Abb. 12 zeigt, dass das Milzgewicht im Verhältnis zum Gesamtgewicht bei cGKI-mutierten Mäusen im Vergleich zu WT-Tieren hochsignifikant erhöht ist, wobei die Ausprägung bei KO-Mäusen im Durchschnitt stärker ist als bei β-Res.-Tieren (linke Spalte). Bei Behandlung der Mäuse mit Esomeprazol-haltigem Futter besteht kein signifikanter Unterschied mehr zwischen WT- und cGKI-mutierten Tieren (rechte Spalte). PPI-Gabe verhindert somit die Ausbildung einer Splenomegalie bei cGKI KO- und β-Rescue-Mäusen.

Abbildung 13 zeigt das Milzgewicht/Gesamtgewicht-Verhältnis in Abhängigkeit vom Alter unter Einbeziehung älterer β -Res.-Mäuse. Dabei ist auffällig, dass viele der mutierten Tiere im fortgeschrittenen Alter eine extrem große Milz (basierend auf dem Quotienten Milzgewicht/Körpergewicht) aufweisen, d.h. die Splenomegalie sich im Alter verschlimmert.

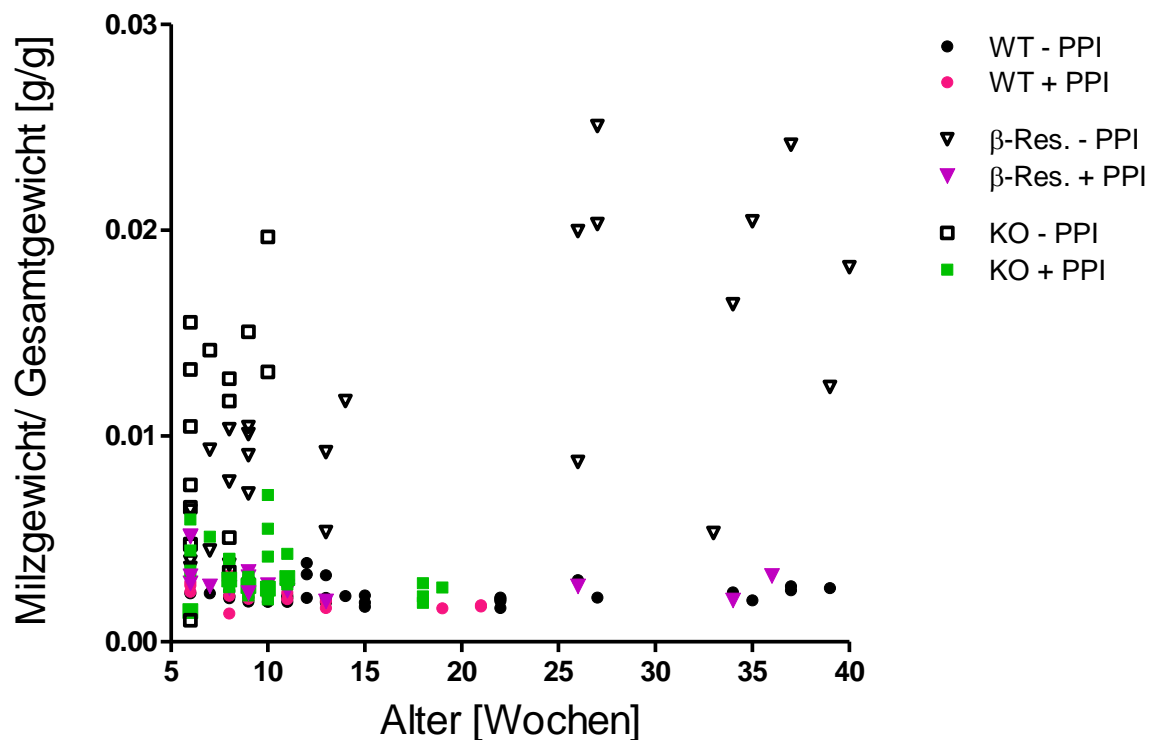


Abbildung 13: Milzgewicht im Verhältnis zum Gesamtgewicht in Abhängigkeit vom Alter.

Das relative Milzgewicht von cGKI KO-, β -Res.- und WT-Tieren ohne (-PPI) und mit (+PPI) PPI-Behandlung (18 mg/kg Futter) ist im Verhältnis zum Mausalter gezeigt. Die Unterscheidung der verschiedenen Mausgruppen ist mit Hilfe der Legende rechts des Graphen möglich.

3.5. Eisenspeicher

Bei einer negativen Eisenbilanz, einem Ungleichgewicht aus Eisenaufnahme und -bedarf werden zunächst die Eisenspeicher entleert. Da freies Eisen toxisch ist, wird das Element in Form von Ferritin und Hämosiderin gespeichert. Ferritin besteht aus 24 Untereinheiten der leichten (FLC) oder schweren Kette (FHC) und wird bei erhöhter intrazellulärer Eisenkonzentration vermehrt gebildet. Bei Eisenmangel ist es hingegen in geringen Mengen vorhanden (Hentze et al., 2010; Nielsen, 2013).

3.5.1. Ferritin-Menge in der Leber und Milz

Da Leber und Milz wichtige Eisenspeicherreservoirs darstellen, wurde die FLC-Menge in diesen Organen untersucht. Der Gesamtproteinextrakt der Leber (je 100 µg) wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) unter Verwendung eines 12 %igen Polyacrylamidgels nach Molekulargewicht aufgetrennt, anschließend zur Quantifizierung elektrophoretisch auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran übertragen und mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen cGKI und FLC detektiert. GAPDH diente als Ladekontrolle. Abbildung 14 A zeigt den Western Blot, 14 B die zugehörige Quantifizierung anhand der Intensität der Banden in Relation zur jeweiligen GAPDH-Bande.

Bei cGKI KO-Mäusen mit normaler Fütterung war die FLC-Proteinmenge in der Leber sehr gering, wohingegen mutierte Tiere, welche mit PPI versetztes Futter erhielten, deutlich mehr Ferritin (gemessen als FLC) aufwiesen und sogar die FLC-WT-Menge überschritten.

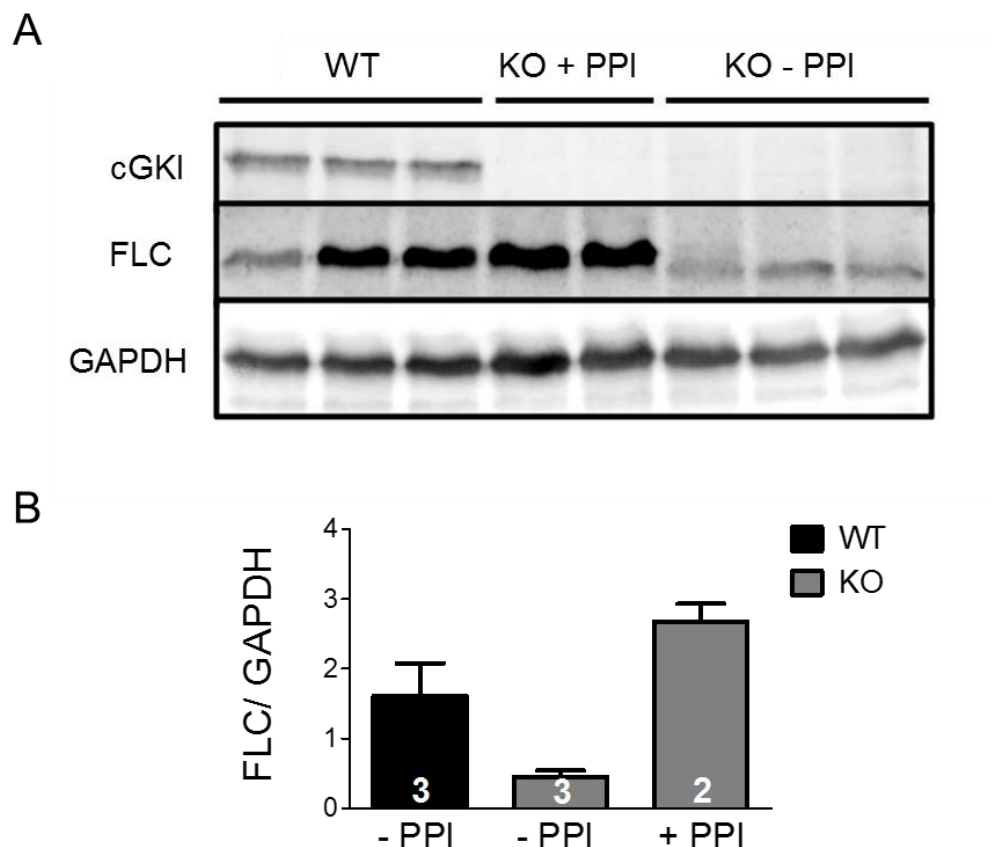


Abbildung 14: Ferritin-leichte-Kette (FLC) in der Leber.

A) Gezeigt ist eine 12 %-SDS-PAGE/Western Blot-Analyse mit je 100 µg Gesamtproteinextrakt aus der Mausleber. Es wurden Antikörper gegen cGKI, FLC und GAPDH (Ladekontrolle) verwendet. WT-Mäuse wurden nicht mit PPI behandelt (-PPI), cGKI KO-Mäuse erhielten mit (+PPI) Esomeprazol versetztes (18 mg/kg) oder normales Futter (-PPI). Das Alter der Tiere betrug 8-14 Wochen.

B) Quantifizierung des Western Blots aus A.

Ergebnisse

In der Milz findet die Wiederverwertung alter Blutzellen statt. Das daraus gewonnene Eisen ist für den Körper essentiell und kann in Form von Ferritin oder Hämosiderin gespeichert werden oder über Ferroportin ins Plasma exportiert und gebunden an Transferrin an die Stellen des Bedarfs transportiert werden (Silva and Faustino, 2015).

Um auch die Eisenspeicher in der Milz zu überprüfen wurde der Gesamtproteinextrakt der Milz mittels SDS-PAGE (12 %iges Gel) aufgetrennt und im Western Blot unter Verwendung spezifischer Antikörpern gegen cGKI, FLC und GAPDH als Ladekontrolle analysiert. Wie Abb. 15 A zeigt, war FLC bei cGKI KO-Mäusen mit normaler Fütterung trotz einer Proteinmenge von 120 µg nicht detektierbar, d.h. die Eisenspeicher waren entleert. Für Mäuse mit PPI-Behandlung war eine deutliche FLC Bande ersichtlich, welche durch Eiseninjektion noch verstärkt erschien. Abbildung 15 B zeigt die Zusammenfassung des Western Blot aus A.

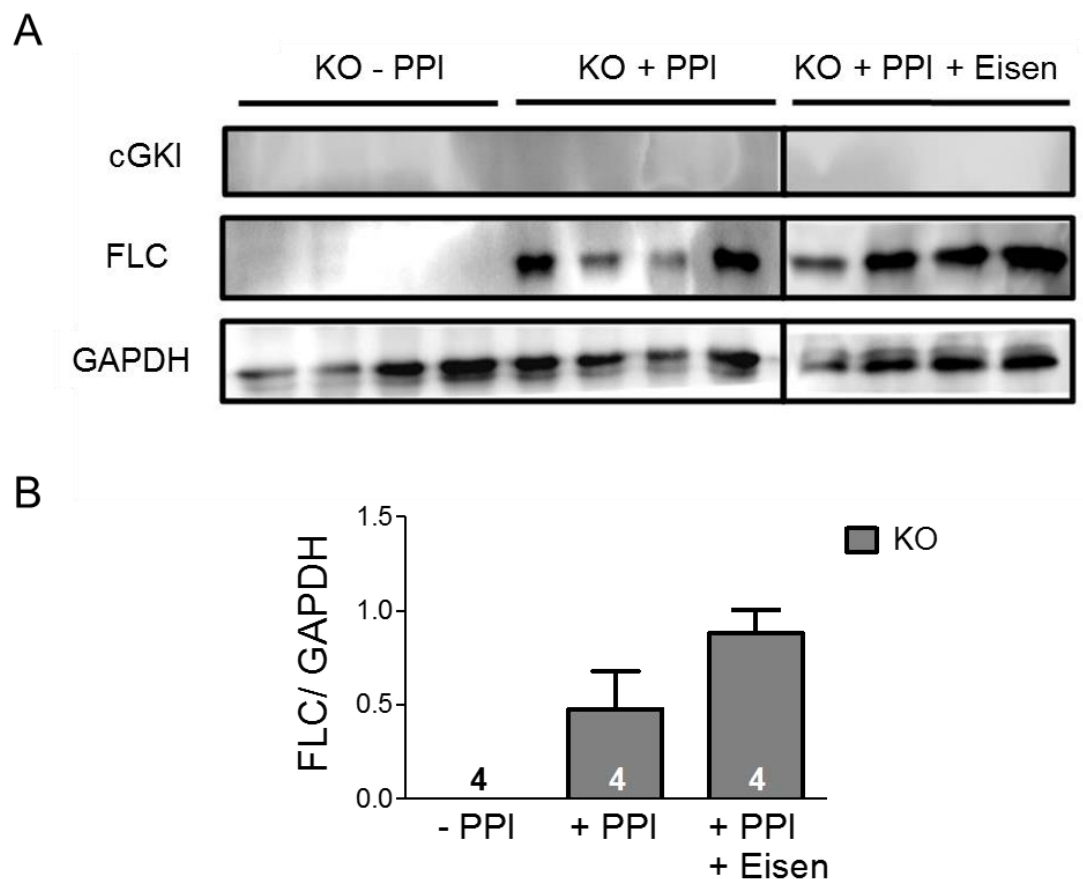


Abbildung 15: Ferritin-leichte-Kette (FLC) in der Milz.

A) Gezeigt ist eine 12 %-SDS-PAGE/Western Blot-Analyse mit je 120 µg Gesamtproteinextrakt aus der Mausmilz. Es wurden Antikörper gegen cGKI, FLC und GAPDH (Ladekontrolle) verwendet. cGKI KO-Mäuse erhielten Futter ohne (-PPI) oder mit (+PPI) PPI (18mg/kg) und wurden soweit angegeben i.p. mit Eisen (6x 0,8 mg Fe³⁺) injiziert. Das Alter der Tiere betrug 8-14 Wochen.

B) Quantifizierung des Western Blots aus A.

3.5.2. Histologische Untersuchungen

Diese durch Western Blot identifizierten Eisenmangelerscheinungen sollten auf histologischer Ebene bestätigt werden. Dazu wurden 10 µm dicke Milzgewebeschnitte angefertigt und anschließend eine Berliner Blau-Färbung durchgeführt, bei der im sauren Milieu gelöstes dreiwertiges Eisen mit Kaliumhexacyanoferrat zu einem blauen Komplex reagiert. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Safranin O (rot). Da Eisen in Hämosiderin und Ferritin in dreiwertiger Form vorliegt, kann dieses durch die Berliner Blau-Färbung sichtbar gemacht werden, wobei das lose gebundene Eisen des Hämosiderins besser erkennbar ist (Iancu, 1989; Richter, 1978).

Abbildung 16 zeigt charakteristische Milzgewebeschnitte von WT-, cGKI KO- und β -Res.-Mäusen nach Berliner Blau-Färbung. In cGKI-mutierten Tieren mit normaler Fütterung (-PPI) war im Gegensatz zu Kontrolltieren kaum eine blaue Färbung zu erkennen, d.h. Fe^{3+} konnte nicht detektiert werden (linke Spalte, Mitte + unten). Im Einklang mit den Ergebnissen für das Speicherprotein Ferritin war bei Mäusen mit PPI-Fütterung ein Fe^{3+} -Anstieg (ersichtlich als eine vermehrte Blaufärbung) in der roten Pulpa der Milz zu beobachten. Eisen-Injektionen (wie bereits beschrieben) führten ebenfalls zu einem Anstieg der Fe^{3+} -Einlagerungen in der Milz (siehe rechte Spalte).

Durch PPI-Gabe als auch Eiseninjektion konnten die Mangelerscheinungen in der Milz von cGKI-defizienten Mäusen verhindert werden.

Ergebnisse

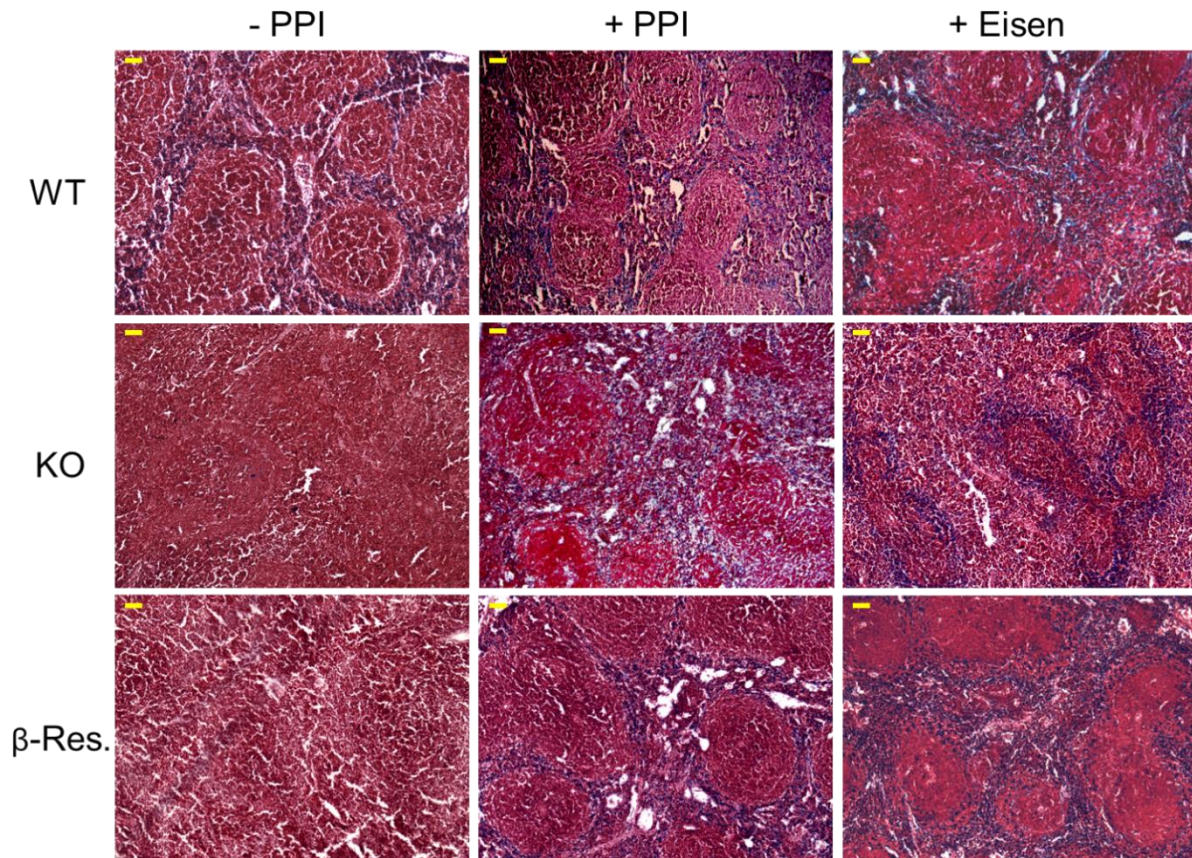


Abbildung 16: Berliner Blau-Färbung von Milzgewebeschnitten.

Es sind charakteristische Berliner Blau-Färbungen von 10 μm dicken Milzgewebeschnitten gezeigt. WT-, cGKI KO- und β -Res.-Mäuse erhielten normales (-PPI) oder mit PPI-versetztes Futter (+PP) (18 mg/kg) und wurden soweit angegeben i.p. mit Eisen injiziert (+Eisen) (6x 0,8 mg Fe^{3+}). Fe^{3+} erscheint blau, Nuclei rot, Plasma rosa. Maßstab 100 μm .

3.5.3. Plasma-Eisenkonzentration

Nach Entleerung der Eisenspeicher wirken sich die Mangelercheinungen des Elements üblicherweise auf das Erythron-Eisen aus. Ein Indikator für den fortgeschrittenen Abfall ist der Eisengehalt im zirkulierenden Blut. Eisen liegt im Plasma überwiegend an Transferrin gebunden und in kleinen Mengen auch in Form von Ferritin vor (Lohr and Keppler, 2005).

Mit dem QuantiChrom™ Iron Assay Kit wurde der Gesamteisengehalt im Plasma bestimmt. Fe^{3+} wird dabei zu Fe^{2+} reduziert, welches mit dem zugegebenen Chromogen einen blauen Komplex bildet, der photometrisch vermessen werden kann. Abb. 17 zeigt die Ergebnisse der Messung. Die Plasmaeisen-Konzentrationen waren mit $41,14 \pm 4,46 \mu\text{g/dl}$ bei cGKI KO- und $63,79 \pm 5,69 \mu\text{g/dl}$ bei β -Res.-Mäusen signifikant niedriger als jene der WT-Tiere mit $128,55 \pm 9,57 \mu\text{g/dl}$. Erhielten die mutierten Mäuse von Geburt an PPI-haltiges Futter, so ergab sich ein

Ergebnisse

Gesamteisengehalt von $102,66 \pm 11,72 \mu\text{g/dl}$ bei cGKI KO- und $107,32 \pm 5,40 \mu\text{g/dl}$ bei β -Res.-Mäusen. Es bestand somit kein wesentlicher Unterschied mehr zu den Kontrolltieren.

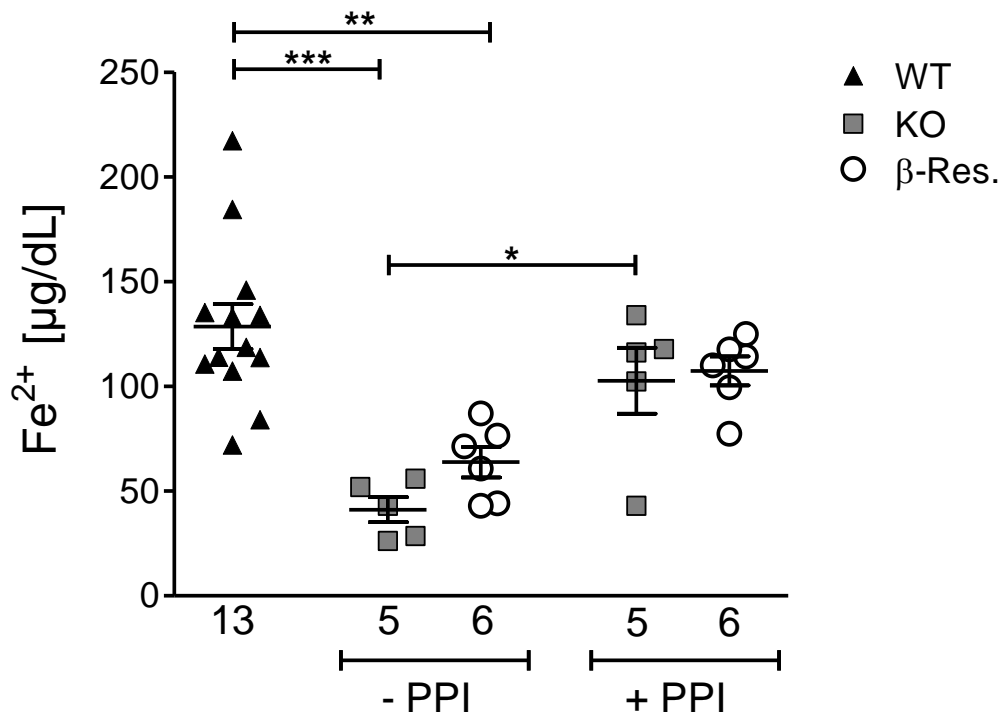


Abbildung 17: Gesamteisengehalt im Plasma.

Die Plasmaeisenkonzentration von cGKI KO- und β -Res.-Mäusen wurde ohne (-PPI) und mit (+PPI) PPI-Behandlung bestimmt. Die Konzentrationen von WT-Mäusen ohne und mit PPI wurden zusammengefasst, da sie sich nicht wesentlich unterschieden. Die Mauszahlen sind unter der x-Achse gegeben. Das Alter der Tiere betrug 6-11 Wochen. ***, $P < 0,001$; **, $P < 0,01$; *, $P < 0,05$.

PPI-Gabe verhinderte folglich die Entleerung der Eisenspeicher sowie die Absenkung des Plasmaeisens.

3.6. Das HAMP-mRNA-Level in der Leber

Hepcidin ist der Hauptregulator der systemischen Eisenhomöostase. Das Hormon bindet an den bisher einzigen bekannten Eisenexporter Ferroportin und initiiert in Folge dessen Degradierung, sodass die Eisenabgabe aus den essentiellen Eisenquellen, nämlich den Enterozyten des Dünndarms, den Makrophagen des retikuloendothelialen Systems und den Speichern der Leber und anderer Organe gehemmt wird. Das zugehörige Gen ist *Hamp*. Die Gen-Expression des Eisenregulators findet überwiegend in der Leber statt und wird durch die

Ergebnisse

Eisenspeicher, die Erythropoese, die Hypoxie sowie durch Entzündungsmediatoren gesteuert (Nielsen, 2013).

Um zu eruieren, ob die Anämie und der Eisenmangel der cGKI-defizienten Mäuse auf eine fehlerhafte Heparin-Synthese zurückzuführen sind, wurde das HAMP-mRNA-Level in der Leber bestimmt. Den Mäusen wurden wie in 3.3.1. beschrieben i.p. Eisen (+Eisen) oder Kochsalzlösung (NaCl) injiziert, das Gewebe an Tag 13 entnommen, die RNA isoliert und in Folge mit der komplementären DNA eine quantitative real-time PCR durchgeführt.

Abbildung 18 zeigt, dass die auf GAPDH normalisierte HAMP-mRNA-Konzentration von cGKI KO-Mäusen mit normaler Fütterung signifikant niedriger war als jene der WT-Tiere. Dies ist ein Anzeichen für einen erhöhten Eisenbedarf. Mit Eiseninjektionen stieg die HAMP-Expression der KO-Tiere leicht an, war jedoch noch immer deutlich niedriger als die Vergleichswerte der Wildtyp-Mäuse, d.h. der Verlust bzw. erhöhte Bedarf konnte nicht durch alleinige Eiseninjektionen kompensiert werden. cGKI KO-Mäuse, welche mit PPI versetztes Futter erhielten, unterschieden sich hingegen nicht wesentlich von den Kontrolltieren und reagierten auf die Eiseninjektionen – wie es sein sollte – mit einer verstärkten HAMP-Expression.

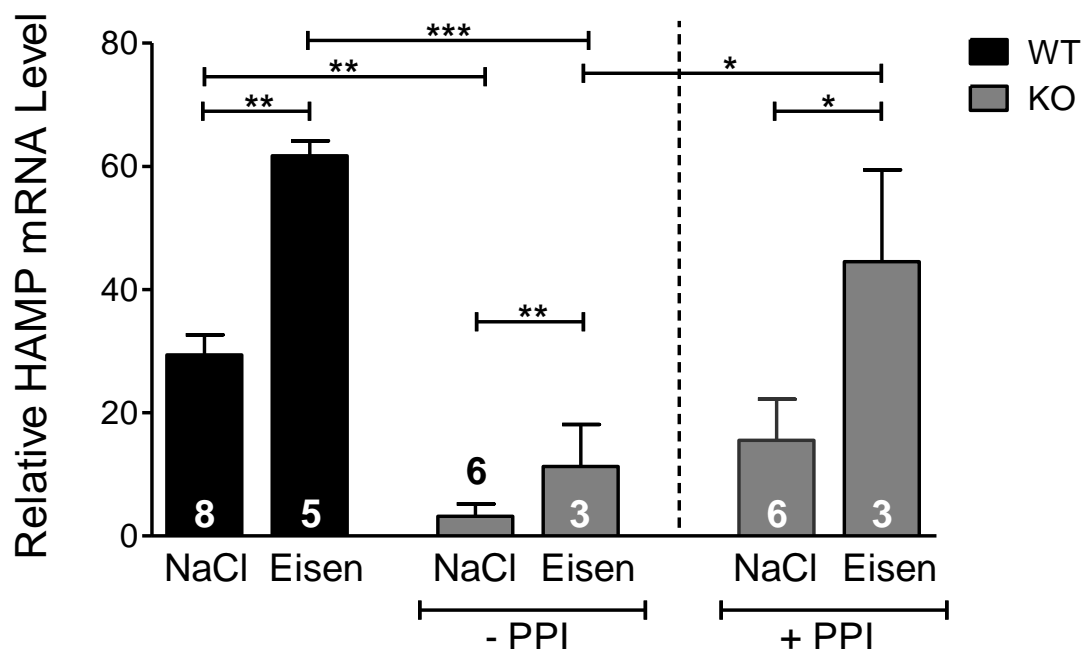


Abbildung 18: Quantitative real-time PCR der relativen Leber-HAMP-mRNA.

WT- und cGKI KO-Mäuse wurden wie bereits beschrieben i.p. mit NaCl oder Eisen injiziert. WT-Tiere erhielten normales Futter, cGKI KO-Mäuse ohne (-PPI) oder mit (+PPI) PPI (18 mg/kg) versetztes Futtermittel. Das Alter der Mäuse betrug 6-12 Wochen. Die Anzahl der Mäuse ist in den Säulen gegeben. ***, $P < 0,001$; **, $P < 0,01$; *, $P < 0,05$.

Dies zeigt, dass der Organismus cGKI-defizienter Mäuse in der Lage ist auf veränderte Eisenkonzentrationen mit einer angepassten HAMP-Expression zu reagieren.

3.7. Das Transferrin-Rezeptor 1-mRNA-Level in der Leber

Der Transferrin-Rezeptor 1 (TfR1) reguliert die Aufnahme von Transferrin-gebundenem Eisen aus dem Plasma in die Zelle und stellt damit einen wichtigen Regulator der Eisenhomöostase auf zellulärer Ebene da. Besteht Eisenmangel in der Zelle, so binden eisenregulierende Proteine (IRPs) an die eisenresponsiven Elemente (IRE) im 3'-untranslatierten Bereich der mRNA und stabilisieren diese, sodass es zu einer vermehrten Translation und dadurch zu einer erhöhten TfR1-Proteinmenge kommt (Hentze et al., 2010). Um die Funktion der Eisenregulierung auf zellulärer Ebene zu überprüfen, wurde das TFR1-mRNA-Level in der Leber und der Milz analysiert. Da die Leber und Milz cGKI-defizienter Mäuse eine deutlich verminderte Ferritin-Menge (gemessen als FLC) im Vergleich zu WT-Mäusen aufwiesen, bestand die Vermutung, dass die TFR1-mRNA erhöht sein würde, d.h. die Zellen der Leber bzw. Milz aufgrund des Eisenmangels vermehrt versuchen würden, Eisen aufzunehmen. Diese Mutmaßung bestätigte sich. Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse der quantitativen real-time PCR für TFR1-mRNA (normalisiert auf GAPDH) in der Leber. Transgene Mäuse mit normaler Fütterung wiesen im Vergleich zu WT-Kontrolltieren ein erhöhtes (wenn auch nicht signifikantes) relatives TFR1-mRNA-Level auf, bei PPI-Gabe war es hingegen normal. Die TFR1-mRNA-Menge in der Milz verhielt sich dementsprechend und war bei cGKI-defizienten Mäusen ohne PPI ebenfalls hochreguliert (nicht gezeigt).

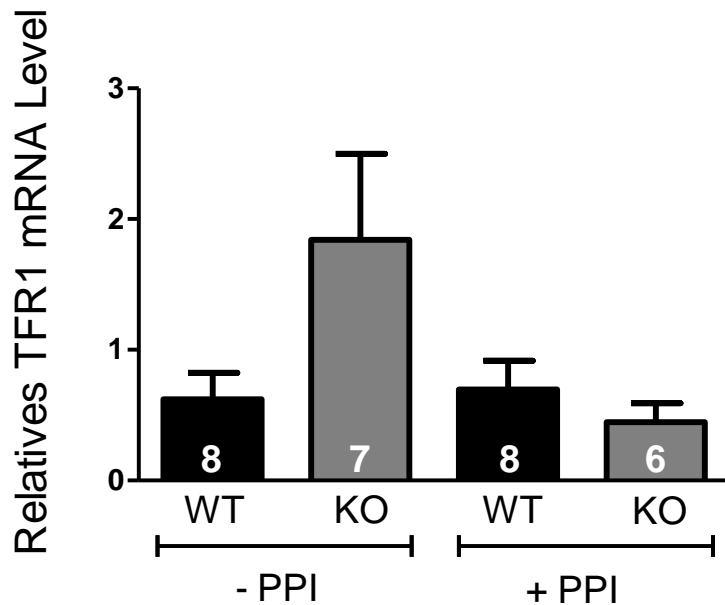


Abbildung 19: Relatives TFR1-mRNA-Level in der Leber.

Das relative TFR1-mRNA-Level (normalisiert auf GAPDH) in der Leber von WT- und cGKI KO- Mäusen ohne (-PPI) oder mit (+PPI) PPI-Fütterung (18 mg/kg) wurde mittels quantitativer real-time PCR ermittelt. Die Anzahl der Mäuse ist in den Säulen gegeben.

3.8. Die Interleukin-6-Konzentration im Blut

Entzündungsmediatoren können den Eisenstoffwechsel wesentlich beeinflussen, indem sie beispielsweise die Hepcidin-Synthese stimulieren (Nielsen, 2013). In der Vergangenheit wurde bereits beobachtet, dass cGKI-defiziente Mäuse eine erhöhte Konzentration des Zytokins Interleukin-6 (IL-6) aufweisen (Lutz et al., 2011; Zhang et al., 2013). Um die Entzündung als mögliche Ursache für die Anämie und den Eisenmangel auszuschließen, wurde mit Hilfe des Quantikine® ELISA die IL-6-Konzentration im Serum von WT-, cGKI KO- und β -Rescue-Mäusen ohne und mit PPI-Fütterung gemessen. In Übereinstimmung mit Zhang et al., waren die IL-6-Werte mit $12,77 \pm 2,07$ pg/ml für cGKI KO- und $9,23 \pm 1,39$ pg/ml für β -Rescue-Mäuse gegenüber den WT-Tieren mit einer durchschnittlichen Konzentration von $4,16 \pm 1,08$ pg/ml deutlich erhöht (Abb. 20). Bei der Fütterung von PPI-haltigem Futter zeigten die IL-6-Level aller Gruppen keine wesentlichen Veränderungen (siehe rechte Spalte).

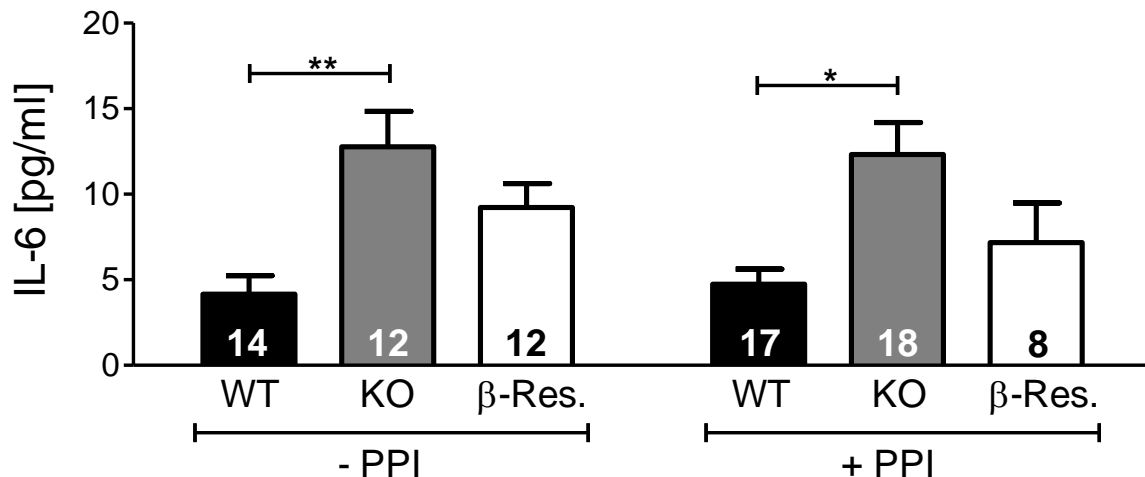


Abbildung 20: Serum-Interleukin-6-Konzentration.

Die Serum Interleukin-6 (IL-6)-Konzentration von 6-15 Wochen alten WT-, cGKI KO- und β -Res-Mäusen wurde ohne (-PPI) und mit (+PPI) (18 mg/kg Futter) PPI-Gabe bestimmt. Die Anzahl der Mäuse ist in den Säulen gegeben. **, $P < 0,01$; *, $P < 0,05$.

3.9. Die Expression der cGKI in Erythrozyten

In der Vergangenheit wurde das Fehlen der cGKI in den Erythrozyten und die dadurch bedingte verminderte Lebensdauer der roten Blutzellen als potentieller Grund für die Anämie cGKI-defizienter Mäuse genannt. Die Ergebnisse hinsichtlich der Expression der cGKI in Erythroblasten bzw. Erythrozyten waren jedoch widersprüchlich. So zeigten immunzytochemische Untersuchungen keine cGKI in Erythroblasten (Weber et al., 2007), wohingegen Föller et al. die cGKI in erythroiden Zellen vorfanden (Föller et al., 2008). Um Klarheit zu schaffen, sollte die Expression des Proteins in roten Blutzellen erneut untersucht werden. Dazu wurde durch Punktion des Herzens Blut von WT-Mäusen entnommen und dieses mit biotinyliertem TER-119 Antikörper versetzt, welcher das TER-119 Antigen an der Zelloberfläche von erythroiden Zellen im späten Reifestadium (frühe Proerythroblasten bis hin zu reifen Erythrozyten) detektiert und diese folglich bindet. Die anschließende Zugabe von Dynabeads® und deren hohe Affinität zu biotinmarkierten Molekülen führte zur Ausbildung von Zell-Antikörper-Dynabead®-Komplexen, welche mit Hilfe eines Magneten isoliert werden konnten. Die Dynabeads® wurden dann durch DNase I gelöst und die erythroiden Zellen nach entsprechender Präparation mittels SDS-PAGE (12 %) und Western Blot analysiert.

Ergebnisse

Der Western Blot in Abbildung 21 A zeigt, dass die cGKI in den aus dem Blut von WT-Mäusen isolierten TER-119-positiven Zellen nicht detektiert werden konnte, wohingegen die Positivkontrollen, das Enzym cGKI α und der Gesamtgewebeextrakt der Milz zweier WT-Mäuse, eine deutliche cGKI-Bande zeigten. Da Retikulozyten und Erythrozyten, die TER-119-positiven Zellen im Blut, reich an Hämoglobin sind, diente Hämoglobin α (Hb α) als Ladekontrolle.

Die Ergebnisse aus Abb. 21 A wurden in zwei weiteren unabhängigen Laboren bestätigt. Der Western Blot in Abb. 21 B wurde von Prof. Lukowski zur Verfügung gestellt und zeigt Erythrozyten und Thrombozyten, welche über differentiale Zentrifugation aus dem Blut von vier Wildtyp-Mäusen gewonnen wurden. Antikörper gegen den Transferrin-Rezeptor 1 (TfR1) und den Phosphodiesterasehemmer-5 (PDE-5) dienten zur Identifizierung und Differenzierung der beiden Zelltypen, β -Actin als Ladekontrolle. Wie bereits in Abb. 21 A zu beobachten, konnten auch in diesem Blot keine signifikanten Mengen des cGKI-Proteins in den Erythrozyten nachgewiesen werden. Gemäß dem Western Blot in Abb. 21 C, der aus dem Labor von Prof. Schlossmann stammt, wird die cGKI ebenfalls nicht in den Erythrozyten von WT (Linie 2)- und α -Res.-Mäusen (Linie 3) exprimiert. Der Gesamtgewebeextrakt des Magens diente als Positivkontrolle für cGKI (Linie 1), GAPDH als Ladekontrolle. Die Isolation und Aufreinigung der Zellen erfolgte in C abermals durch Differentialzentrifugation aus dem Blut.

Ergebnisse

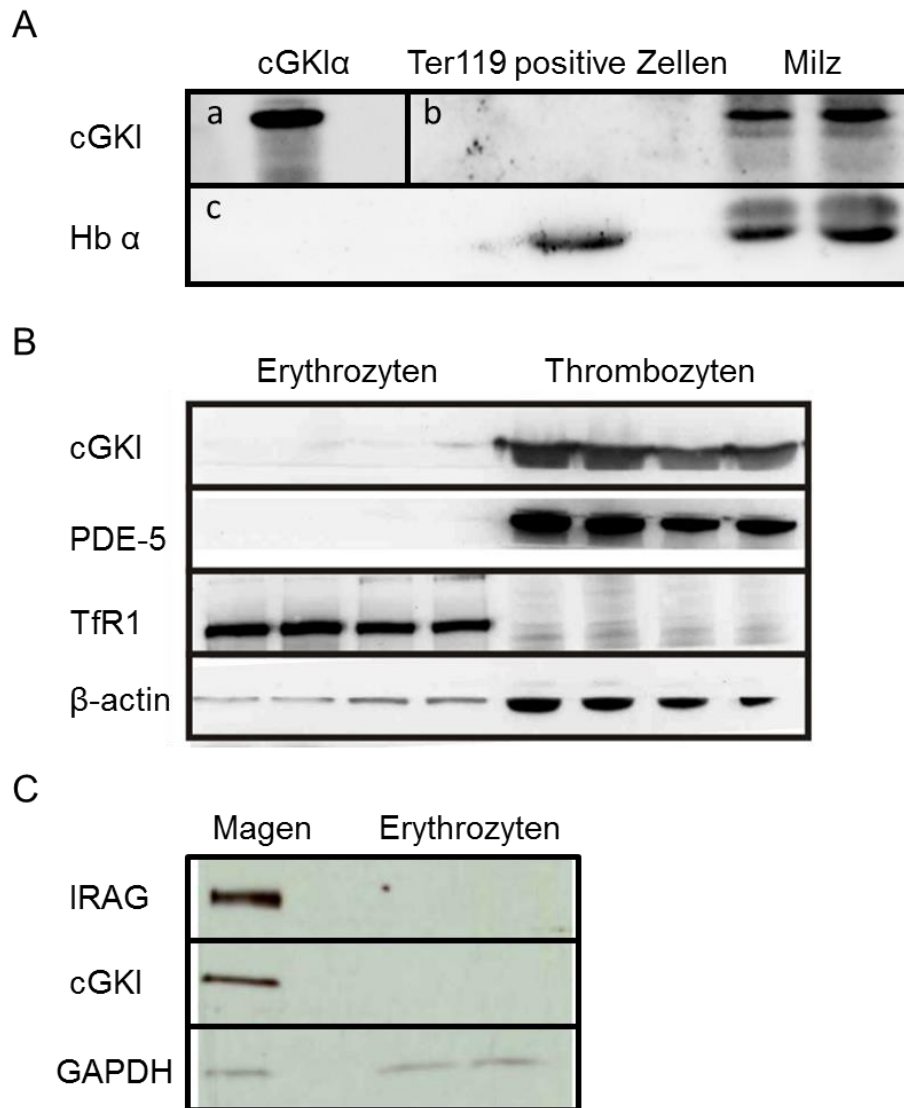


Abbildung 21: Expression der cGKI in Erythrozyten.

- 12 %-SDS-PAGE/Western Blot-Analyse von cGKI α -Enzym (5ng), immunomagnetisch isolierten TER-119-positiven Zellen aus dem Blut von WT-Mäusen (45 μ g) und WT-Milzgesamtwegewebeextrakt (100 μ g). Hämoglobin α (Hb α) diente als Ladekontrolle; Belichtung der Western Blots für 4 (Abb. 21 Aa), 30 (Abb. 21 Ab) oder 1 Sekunde(n) (Abb. 21 Ac).
- 8 %-SDS-PAGE/Western Blot-Analyse von je 30 μ g Erythrozyten- oder je 40 μ g Thrombozyten-Zelllysate. Die Isolation und Aufreinigung der Erythrozyten/Thrombozyten erfolgte durch Differentialzentrifugation des Blutes von 4 Wildtypmäusen. Es wurden Antikörper gegen cGKI, PDE-5 (Phosphodiesterase-5-Hemmer), TfR1 (Transferrin-Rezeptor 1) und β -Actin als Ladekontrolle verwendet.
- 12 %-SDS-PAGE/Western Blot-Analyse von 70 μ g Magengewebeextrakt einer WT-Maus, 70 μ g Erythrozyten-Zelllysate einer WT (Linie 2)- und einer α -Res. (Linie 3)-Maus. Es wurden Antikörper gegen cGKI, IRAG (IP3-Rezeptor assoziiertes cGMP-Kinase Substrat) und GAPDH als Ladekontrolle verwendet.

4. Diskussion

Die Anämie der cGKI KO- und β -Res.-Mäuse ist bedingt durch das blutende duodenale Ulcus, welches diese Tiere entwickeln. Das Fehlen der cGKI im zentralen Nervensystem, im *Nucleus tractus solitarius*, verhindert die Signaltransduktion vom afferenten auf den efferenten Nervus vagus. Dies führt zu einer verminderten Bikarbonatsekretion und schließlich zur Ausbildung eines Geschwürs im Duodenum, da der HCO_3^- -Ausstoß einen wichtigen Schutzmechanismus des Zwölffingerdarms vor der aggressiven Magensäure darstellt. Ulcera können mit Protonenpumpeninhibitoren (PPIs) behandelt werden, da diese die Protonenkonzentration erniedrigen, indem sie in ihrer aktivierten Form die Protonenpumpe H^+/K^+ -ATPase in den Parietalzellen des Magens hemmen.

4.1. Folgen der Behandlung mit PPIs

cGKI KO-Mäuse weisen eine äußerst geringe Lebenszeit auf (Abb. 7). Die Verabreichung des PPI Esomeprazol, welcher in Form von MUPS® („multiple unit pellet systems“) ins Futtermittel verpresst wurde, führte zu einer deutlichen Erhöhung der Lebensdauer bei cGKI KO-Mäusen (Abb. 7) (Singh et al., 2012). Dennoch verstarben etwa 40 % der Tiere mit PPI-Fütterung in den ersten 5 Wochen. Bei der Verabreichung von Protonenpumpeninhibitoren geht nur ein sehr geringer Anteil des Wirkstoffs in die Muttermilch über (Plante et al., 2004). Die beobachtete hohe Sterberate in den ersten Wochen der cGKI-Mäuse lässt sich dadurch begründen, dass die Jungtiere in diesem Zeitraum kaum Wirkstoff erhalten, da sie überwiegend durch Säugen ernährt werden. Die gesicherte Aufnahme des PPI Esomeprazol ist somit erst mit dem ausschließlichen Konsum der festen Nahrung gewährleistet, welche nach dem Absetzen der Jungtiere von den Müttern im Alter von 4-5 Wochen erfolgt.

Das Ulcus der cGKI KO-Mäuse scheint eine lebensbedrohliche Situation für diese Tiere darzustellen. Die Vermeidung der Ulcusbildung mit PPI-Behandlung führt folglich zu einer Erhöhung der Lebensdauer.

Mit Hilfe des Haemocult®-Tests auf okkultes Blut im Stuhl wurde gezeigt, dass die intestinale Blutung der cGKI-defizienten Mäuse mit der Fütterung von PPI-haltigem Futter (18 mg/kg) größtenteils gestoppt werden konnte (Abb. 8). Nur noch 8 % der cGKI KO- und 18 %

der β -Res.-Tiere mit Esomeprazol-Gabe wiesen Blut in den Fäkalien auf (ohne PPI: KO 90 %; β -Res. 87 %). Dies bestätigt, dass durch die PPI-Fütterung die intestinale Blutung vermieden werden konnte.

cGKI-defiziente Mäuse mit normaler Fütterung hatten aufgrund des gezeigten Blutverlustes (siehe Abb. 8) extrem verminderte Hämoglobin-Konzentrationen (Abb. 9 B), stark reduzierte Erythrozyten-Zahlen (Abb. 9 A) und Hämatokrit-Werte (Abb. 9 C) sowie vergrößerte rote Blutzellen (MCV) (Abb. 9 E) und eine gesteigerte Verteilungsbreite dieser Zellen (RDW) (Abb. 9 F). Um den Blutverlust zu kompensieren, wurde die Erythropoese angeregt. Dies macht sich in einer erhöhten Erythropoetin-Konzentrationen (nicht gezeigt) und einer extrem vermehrten Retikulozytenzahl (Abb. 9 D) im Blut bemerkbar. Folglich beruht die Anämie der Tiere nicht auf einer verminderten Erythropoeseaktivität, sondern es handelt sich um eine hyperregenerative Anämie mit erhöhter Retikulozytenzahl (Lohr et al., 2005).

Die hohe Anzahl von Retikulozyten scheint auch die Ursache für die erhöhten MCV- und RDW-Werte zu sein: diese Parameter wurden bei dem verwendeten Sysmex XT2000iV Hämatologieautomaten aus der Gesamtheit roter Blutzellen (Retikulozyten und Erythrozyten) ermittelt, wobei Retikulozyten größer sind als Erythrozyten. Die hohe Retikulozytenzahl (KO: 22,7 %; β -Res.: 21,2 %; WT: 3,4 % aller roter Blutzellen) der cGKI-defizienten Tiere führt somit zu einem größerem durchschnittlichen Volumen roter Blutzellen (MCV) und zu einer größeren Verteilungsbreite der roten Blutkörperchen (RDW).

Wurde den Tieren PPI-haltiges Futter verabreicht, so normalisierten sich die genannten Blutparameter, einschließlich der Retikulozytenzahl, dem MCV- und RDW-Wert (Abb. 11). Dies lässt darauf schließen, dass die Anämie der Mäuse durch die Ulcusblutung bedingt ist. Die Verabreichung von PPI verhindert die Ausbildung des Geschwürs im Duodenum und damit die Anämie bei cGKI KO- und β -Res.-Mäusen.

Bei cGKI-defizienten Mäusen ist eine Vergrößerung der Milz (Abb. 12) und eine erhöhte Anzahl erythroider Zellen in der Milz (nicht gezeigt) zu beobachten. Bei PPI-Behandlung tritt die Vergrößerung der Milz nicht auf (Abb. 12). Die Splenomegalie scheint somit eine Folgeerscheinung der Anämie und nicht die primäre Ursache für die Blutarmut zu sein. Die Beobachtung, dass die Vergrößerung der Milz erst einige Wochen nach der Anämie auftritt, wurde auch durch Föller et al. beschrieben.

Neben der Eliminierung überalterter oder veränderter roter Blutzellen aus der Zirkulation ist die Milz von Mäusen ein Ort der juvenilen und adulten Hämatopoese. Das Organ dient vor allem bei Stressfunktionen als Reserve für eine beschleunigte Erythropoese (Everds, 2007). Zudem kann die Milz die Retikulozyten des Knochenmarks einbehalten, um diese dort ihrem finalen Reifungsprozess zu unterziehen (Song and Groom, 1972).

Die verstärkte Erythropoese und das Einfangen der in großen Mengen vorhandenen Retikulozyten sind mögliche Gründe für die erhöhte Anzahl erythroider Zellen in der Milz und die Vergrößerung des Organs.

Bleiben die cGKI-defizienten Mäuse unbehandelt, so besteht die Gefahr des Hypersplenismus, einer verstärkten Eliminierung von Blutzellen als Folge der vergrößerten Milz (Classen et al., 2004). Alte β -Res.-Mäuse weisen eine extrem große Milz auf (siehe Abb. 13). Die weitere Volumenzunahme des Organs führt wiederum zu einer vermehrten Retention roter Blutzellen. Es entsteht ein Teufelskreis: Splenomegalie und Anämie potenzieren einander.

Ein Großteil des täglichen Eisenbedarfs von Säugetieren wird durch die Wiederverwertung des Eisens alter roter Blutzellen gewonnen (Hentze et al., 2010). Der Verlust roter Blutzellen durch die duodenale Blutung bei cGKI-defizienten Mäusen führt daher zu einer negativen Eisenbilanz. Als Folge kommt es zu einer Entleerung der Eisenspeicher, was sich durch eine verminderte Menge des Speicherproteins Ferritin in Leber und Milz (Abb. 14; Abb. 15) bemerkbar machte. Histochemische Untersuchungen bestätigten den geringen Fe^{3+} -Gehalt in der Milz (Abb. 16).

Nach Entleerung der Eisenspeicher wirken sich die Mangelercheinungen des Elements auf das Erythron-Eisen aus. Dies zeigt sich anhand des stark verringerten Gesamteisengehalts im Plasma cGKI-defizienter Mäuse (Abb. 17).

Mutierte Mäuse mit PPI-Behandlung weisen hingegen keine verminderte Ferritin-Menge in der Leber oder Milz (Abb. 14; Abb. 15) sowie normale Plasmaeisenkonzentrationen (Abb. 17) auf, wodurch bestätigt wird, dass die Eisen-Defizite eine Folge des duodenalen Ulcus sind. Eiseninjektionen bei cGKI-defizienten Mäusen steigern den Eisengehalt in der Milz (Abb. 15; Abb. 16) und Leber (nicht gezeigt).

Durch PPI-Gabe als auch Eiseninjektion konnten die Mangelercheinungen in der Milz und Leber von cGKI-defizienten Mäusen verhindert werden.

4.2. Erörterung weiterer möglicher Ursachen für die Anämie

In der Vergangenheit wurde die Eryptose cGKI-defizienter Erythrozyten und die Ansammlung der roten Blutzellen in der Milz als Grund für die Anämie und die Splenomegalie genannt. Dabei soll das Fehlen der cGKI zu einer vermehrten Exposition des Phospholipids Phosphatidylserin an der Zelloberfläche der Erythrozyten führen und die Phagozytose durch Makrophagen induzieren (Lang et al., 2014) (Foller et al., 2008).

Da immunhistochemische Untersuchungen jedoch keine cGKI in Erythroblasten zeigten (Weber et al., 2007), wurde die Expression des Proteins in Erythrozyten von Wildtyp-Mäusen erneut analysiert. Es erfolgte eine immunomagnetische Isolierung der erythroiden Zellen im Blut, sowie eine anschließende Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blot. Es konnte keine cGKI in den Erythrozyten detektiert werden (Abb. 21 A). Die Forscher zweier weiterer Labore kamen unter Verwendung verschiedener Isolations- und Reinigungsmethoden zu demselben Ergebnis (Abb. 21 B, 21 C): die cGKI wird nicht in Erythrozyten exprimiert.

Eine durch das Fehlen der cGKI bedingte vermehrte Eryptose und verkürzte Lebenszeit der roten Blutzellen erscheint somit als Grund für die Anämie und Splenomegalie als äußerst unwahrscheinlich. Zudem sollte beachtet werden, dass zum Zeitpunkt der Veröffentlichung der Arbeit von Föllner et al., in der die Eryptose cGKI-defizienter Erythrozyten als Grund für die Anämie genannt wurde, das blutende duodenale Ulcus der cGKI-defizienten Tiere noch nicht bekannt war und somit nicht in die Überlegungen mit einbezogen wurde.

Da alle Anzeichen der Erkrankung durch die PPI-Behandlungen geheilt werden konnten, wurde die genannte Hypothese nicht weiter verfolgt.

Um eine fehlerhafte systematische Eisenregulierung als weitere mögliche Ursache für die Anämie und den Eisenmangel auszuschließen, wurde die Hepcidin-Synthese in der Leber, dem Hauptsyntheseort des Hormons, untersucht. Das relative mRNA-Level des systemischen Eisenregulators verhält sich entsprechend des Eisengehalts, d.h. es ist bei cGKI KO-Mäusen deutlich niedriger als bei entsprechenden Mäusen mit PPI-Fütterung oder WT-Kontrolltieren, reagiert jedoch – wie es sein sollte – auf Eiseninjektionen mit einer Hochregulierung (Abb. 18). Dies lässt darauf schließen, dass die Anämie und der Eisenmangel der cGKI-defizienten Mäuse nicht auf eine fehlerhafte Hepcidin-Synthese zurückzuführen ist, sondern der Organismus in

der Lage ist, auf Eisenmangel bzw. erhöhten Eisenbedarf mit einer verminderten HAMP-Expression zu reagieren.

Auch der Transferrin-Rezeptors 1, welcher die Aufnahme des Elements in die Zelle bestimmt, richtete sich nach dem Eisengehalt der Zelle bzw. des Gewebes. So war die relative mRNA-Menge in der Leber (Abb. 19) und der Milz (nicht gezeigt) bei cGKI KO-Mäusen aufgrund der Eisenmangelerscheinungen erhöht, wohingegen mutierte Tiere mit PPI-Fütterung ein normales TFR1-mRNA-Level zeigten. Dies weist darauf hin, dass die cGKI-defizienten Mäuse in der Lage sind auf zellulärer Ebene auf veränderte Eisenkonzentrationen zu reagieren.

Entzündungen können den Eisenstoffwechsel wesentlich beeinflussen und sowohl zu Mangelerscheinung des Elements als auch zur Anämie führen. In der Vergangenheit wurde bereits beobachtet, dass cGKI-defiziente Mäuse eine erhöhte Konzentration des Zytokins Interleukin-6 (IL-6) aufweisen (Lutz et al., 2011; Zhang et al., 2013). Um auszuschließen, dass die beobachteten positiven Effekte des Protonenpumpenhemmers Esomeprazol auf einen Rückgang der Entzündung zurückzuführen sind, wurden die IL-6-Konzentrationen ohne und mit PPI-Gabe untersucht. cGKI KO- und β -Res.-Mäuse, welche mit PPI versetztes Futter erhielten, zeigten ein unverändert hohes IL-6-Level im Serum (Abb. 20). Die positiven Effekte der PPI-Behandlung sind somit nicht auf eine veränderte IL-6-Konzentration zurückzuführen. Viele der durch Entzündungsmediatoren bedingten Eisenmangelerscheinungen und Anämien beruhen zudem auf einer vermehrten Hepcidin-Synthese (Chifman et al., 2014; Silva and Faustino, 2015). Die Tatsache, dass das HAMP-RNA-Level der cGKI KO-Mäuse extrem niedrig war, spricht zudem nicht für die Entzündung als Ursache der Anämie.

Die bei cGKI-defizienten Mäusen beobachteten verminderten Hämoglobin-Konzentrationen, die reduzierten Erythrozytenzahlen und Hämatokrit-Werte sowie die erhöhten Retikulozytenzahlen könnten auch auf eine hämolytische Anämie hinweisen. Dabei handelt es sich um eine Blutarmut aufgrund der vermehrten intravasalen oder extravasalen Zerstörung roter Blutzellen. Ein wichtiges Merkmal der Hämolyse ist die Verminderung des Haptoglobins, welches freies Hämoglobin bindet und in kürzester Zeit aus dem Plasma eliminiert (Classen et al., 2004). Die Haptoglobin-Konzentration im Blut von cGKI KO unterschied sich nicht von jener

der Kontrolltiere, sodass Hämolyse als Ursache für die Anämie bereits ausgeschlossen wurde (Foller et al., 2008).

Ein erhöhtes mittleres korpuskuläres Volumen (MCV), welches auch bei cGKI-defizienten Mäusen auftritt, könnte auch ein Anzeichen für einen Vitamin-B₁₂- oder Folsäuremangel sein. Beide Substanzen wirken auf die DNA-Synthese und beeinflussen die erythropoetische Proliferationsrate. Mangelerscheinungen haben eine verzögerte Zellteilung zu Folge, wodurch sich stark vergrößerte Zellen ergeben (Lohr and Keppler, 2005). Die in der Vergangenheit gemessenen Vitamin-B₁₂- und Folsäurekonzentrationen cGKI-defizienter Mäuse ergaben keine signifikanten Unterschiede zu Kontrolltieren (Foller et al., 2008). Die leicht erniedrigten Werte der cGKI KO-Mäuse könnten durch die gastrointestinale Malabsorption bedingt sein. Zudem widerspricht die Regenerierung der MCV-Werte bei PPI-Gabe einem Vitamin-B₁₂- oder Folsäuremangel als Ursache für die Anämie.

Die Verabreichung des PPI Esomeprazol führte zu Heilung der Anämie und des dadurch bedingten Eisenmangels bei cGKI KO- und β -Res.-Mäusen. Esomeprazol ist ein sehr spezifischer Hemmstoff der gastrischen H⁺/K⁺-ATPase (Lindberg et al., 2003), welche überwiegend im Magen und in viel geringerem Maße auch im humanen Kehlkopf und der Submandibulardrüse (Altman et al., 2011) sowie in den Gangzellen des Pankreas (Wang et al., 2015) exprimiert wird. Die gastrische Protonenpumpe H⁺/K⁺-ATPase war jedoch nicht in Leukozyten und im Knochenmark zu finden (Herrmann et al., 2007). Keine der genannten Gewebe, welche die H⁺/K⁺-ATPase exprimieren, sind – soweit bekannt – in die Erythrozytenreifung involviert. Zudem ist es äußerst unwahrscheinlich, dass Esomeprazol die Anämie über einen bisher unbekannten Effekt außerhalb des Magens beeinflusst.

5. Zusammenfassung

cGKI-defiziente Mäuse entwickeln eine Anämie sowie Eisenmangelercheinungen. Diese Arbeit zeigt die dominierende Ursache dafür: Das Fehlen der cGMP-abhängigen Proteinkinase I in Neuronen führt zu einer verminderten Bikarbonatsekretion, sodass diese Tiere den sauren Magensaft nicht neutralisieren können und somit ein blutendes duodenales Ulcus entwickeln (Singh et al., 2012). Die Inhibierung der gastrischen Protonenpumpe durch die Verabreichung des Protoneninhibitors Esomeprazol (18mg/kg Futter) neutralisiert den pH-Wert des Magensaftes, verhindert damit die Bildung des Geschwürs und folglich auch den Blutverlust. Dies wirkt sich positiv auf das Blutbild der cGKI-defizienten Mäuse aus: die Hämoglobinkonzentration, die Erythrozytenzahl, der Hämatokrit-Wert sowie die Retikulozytenzahl und der MCV- und RDW-Wert weisen nach PPI-Einnahme keine Unterschiede zu Kontrolltieren auf. Auch die Folgeerscheinungen der Anämie, die vergrößerte Milz und der Eisenmangel, werden vermieden. Die Rolle der cGKI im Eisenstoffwechsel beschränkt somit auf den durch das Ulcus bedingten chronischen Blutverlust.

Die Gabe des Protoneninhibitors Esomeprazol führte zu einer verlängerten Lebensdauer der cGKI-defizienten Tiere, sodass die Anämie für den frühzeitigen Tod der Tiere mitverantwortlich ist.

In den Erythrozyten von Wildtyp-Mäusen konnte keine cGKI detektiert werden, wodurch ein Erythrozyten-spezifischer Grund für die Anämie, wie die genannte Eryptose und die verminderte Lebensdauer dieser Zellen (Foller et al., 2008), als sehr unwahrscheinlich erscheint.

6. Literaturverzeichnis

- Alioua, A., Y. Tanaka, M. Wallner, F. Hofmann, P. Ruth, P. Meera, and L. Toro. 1998. The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K⁺ channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. *J Biol Chem.* 273:32950-32956.
- Altman, K.W., Y. Kinoshita, M. Tan, D. Burstein, and J.A. Radosevich. 2011. Western blot confirmation of the H⁺/K⁺-ATPase proton pump in the human larynx and submandibular gland. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 145:783-788.
- Andrews, N.C. 1999. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med.* 341:1986-1995.
- Bonnevier, J., and A. Arner. 2004. Actions downstream of cyclic GMP/protein kinase G can reverse protein kinase C-mediated phosphorylation of CPI-17 and Ca(2⁺) sensitization in smooth muscle. *J Biol Chem.* 279:28998-29003.
- Chang, C.C., and L. Kass. 1997. Clinical significance of immature reticulocyte fraction determined by automated reticulocyte counting. *Am J Clin Pathol.* 108:69-73.
- Chao, D.S., F. Silvagno, H. Xia, T.L. Cornwell, T.M. Lincoln, and D.S. Bredt. 1997. Nitric oxide synthase and cyclic GMP-dependent protein kinase concentrated at the neuromuscular endplate. *Neuroscience.* 76:665-672.
- Chifman, J., R. Laubenbacher, and S.V. Torti. 2014. A systems biology approach to iron metabolism. *Adv Exp Med Biol.* 844:201-225.
- Classen, M., V. Diehl, K. Kochsiek, and W.E. Berdel. 2004. Anämien und Störungen des Eisenstoffwechsels in Innere Medizin. Urban & Fischer, München [u.a.]. 699-733 pp.
- Draijer, R., A.B. Vaandrager, C. Nolte, H.R. de Jonge, U. Walter, and V.W. van Hinsbergh. 1995. Expression of cGMP-dependent protein kinase I and phosphorylation of its substrate, vasodilator-stimulated phosphoprotein, in human endothelial cells of different origin. *Circ Res.* 77:897-905.
- El-Husseini, A.E., J. Williams, P.B. Reiner, S. Pelech, and S.R. Vincent. 1999. Localization of the cGMP-dependent protein kinases in relation to nitric oxide synthase in the brain. *J Chem Neuroanat.* 17:45-55.
- Everds, N.E. 2007. Hematology of the Laboratory Mouse in The Mouse in Biomedical-Research, Volume III-Normative Biology, Husbandry and Models, edited by Fox, J.G., Barthold, S. W., Darisson, M. T., Newcomer, C. E., Quimby, F. W., Smith, A. L. Elsevier, Amsterdam [u.a.]. 133-170 pp.
- Feil, R., J. Hartmann, C. Luo, W. Wolfsgruber, K. Schilling, S. Feil, J.J. Barski, M. Meyer, A. Konnerth, C.I. De Zeeuw, and F. Hofmann. 2003. Impairment of LTD and cerebellar learning by Purkinje cell-specific ablation of cGMP-dependent protein kinase I. *J Cell Biol.* 163:295-302.
- Feil, S., P. Zimmermann, A. Knorn, S. Brummer, J. Schlossmann, F. Hofmann, and R. Feil. 2005. Distribution of cGMP-dependent protein kinase type I and its isoforms in the mouse brain and retina. *Neuroscience.* 135:863-868.
- Foller, M., S. Feil, K. Ghoreschi, S. Koka, A. Gerling, M. Thunemann, F. Hofmann, B. Schuler, J. Vogel, B. Pichler, R.S. Kasinathan, J.P. Nicolay, S.M. Huber, F. Lang, and R. Feil. 2008. Anemia and splenomegaly in cGKI-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:6771-6776.
- Forstermann, U., H.H. Schmidt, J.S. Pollock, H. Sheng, J.A. Mitchell, T.D. Warner, M. Nakane, and F. Murad. 1991. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol.* 42:1849-1857.
- Friebe, A., and D. Koesling. 2003. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ Res.* 93:96-105.
- Fukao, M., H.S. Mason, F.C. Britton, J.L. Kenyon, B. Horowitz, and K.D. Keef. 1999. Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072. *J Biol Chem.* 274:10927-10935.
- Gambaryan, S., E. Butt, K. Marcus, M. Glazova, A. Palmethofer, G. Guillon, and A. Smolenski. 2003. cGMP-dependent protein kinase type II regulates basal level of aldosterone production by

- zona glomerulosa cells without increasing expression of the steroidogenic acute regulatory protein gene. *J Biol Chem*. 278:29640-29648.
- Gambaryan, S., C. Hausler, T. Markert, D. Pohler, T. Jarchau, U. Walter, W. Haase, A. Kurtz, and S.M. Lohmann. 1996. Expression of type II cGMP-dependent protein kinase in rat kidney is regulated by dehydration and correlated with renin gene expression. *J Clin Invest*. 98:662-670.
- Ganz, T. 2013. Systemic iron homeostasis. *Physiol Rev*. 93:1721-1741.
- Geiselhoring, A., M. Gaisa, F. Hofmann, and J. Schlossmann. 2004. Distribution of IRAG and cGKI-isoforms in murine tissues. *FEBS Lett*. 575:19-22.
- Haas, B., P. Mayer, K. Jennissen, D. Scholz, M. Berriel Diaz, W. Bloch, S. Herzig, R. Fassler, and A. Pfeifer. 2009. Protein kinase G controls brown fat cell differentiation and mitochondrial biogenesis. *Sci Signal*. 2:ra78.
- Hanafy, K.A., J.S. Krumenacker, and F. Murad. 2001. NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med Sci Monit*. 7:801-819.
- Hartshorne, D.J., M. Ito, and F. Erdodi. 1998. Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation. *J Muscle Res Cell Motil*. 19:325-341.
- Hentze, M.W., M.U. Muckenthaler, B. Galy, and C. Camaschella. 2010. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell*. 142:24-38.
- Herrmann, M., J. Selige, S. Raffael, G. Sachs, A. Brambilla, and T. Klein. 2007. Systematic expression profiling of the gastric H⁺/K⁺ ATPase in human tissue. *Scand J Gastroenterol*. 42:1275-1288.
- Hofmann, F. 2005. The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem*. 280:1-4.
- Hofmann, F., A. Ammendola, and J. Schlossmann. 2000. Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci*. 113:1671-1676.
- Hofmann, F., R. Feil, T. Kleppisch, and J. Schlossmann. 2006. Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiol Rev*. 86:1-23.
- Hofmann, F., and J.W. Wegener. 2013. cGMP-dependent protein kinases (cGK). *Methods Mol Biol*. 1020:17-50.
- Huang, J., H. Zhou, S. Mahavadi, W. Sriwai, and K.S. Murthy. 2007. Inhibition of Galphaq-dependent PLC-beta1 activity by PKG and PKA is mediated by phosphorylation of RGS4 and GRK2. *Am J Physiol Cell Physiol*. 292:C200-208.
- Iancu, T.C. 1989. Iron and neoplasia: ferritin and hemosiderin in tumor cells. *Ultrastruct Pathol*. 13:573-584.
- Ignarro, L.J., G. Cirino, A. Casini, and C. Napoli. 1999. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol*. 34:879-886.
- Joyce, N.C., P. DeCamilli, S.M. Lohmann, and U. Walter. 1986. cGMP-dependent protein kinase is present in high concentrations in contractile cells of the kidney vasculature. *J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res*. 11:191-198.
- Kautz, L., G. Jung, E.V. Valore, S. Rivella, E. Nemeth, and T. Ganz. 2014. Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat Genet*. 46:678-684.
- Keilbach, A., P. Ruth, and F. Hofmann. 1992. Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies. *Eur J Biochem*. 208:467-473.
- Kleppisch, T., A. Pfeifer, P. Klatt, P. Ruth, A. Montkowski, R. Fassler, and F. Hofmann. 1999. Long-term potentiation in the hippocampal CA1 region of mice lacking cGMP-dependent kinases is normal and susceptible to inhibition of nitric oxide synthase. *J Neurosci*. 19:48-55.
- Kleppisch, T., W. Wolfgruber, S. Feil, R. Allmann, C.T. Wotjak, S. Goebbels, K.A. Nave, F. Hofmann, and R. Feil. 2003. Hippocampal cGMP-dependent protein kinase I supports an age- and protein synthesis-dependent component of long-term potentiation but is not essential for spatial reference and contextual memory. *J Neurosci*. 23:6005-6012.
- Koorts, A.M., and M. Viljoen. 2007. Ferritin and ferritin isoforms I: Structure-function relationships, synthesis, degradation and secretion. *Arch Physiol Biochem*. 113:30-54.
- Kuhn, M. 2003. Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A. *Circ Res*. 93:700-709.

- Kumar, A., and V. Lindner. 1997. Remodeling with neointima formation in the mouse carotid artery after cessation of blood flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17:2238-2244.
- Kyhse-Andersen, J. 1984. Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods.* 10:203-209.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Lang, F., M. Abed, E. Lang, and M. Foller. 2014. Oxidative stress and suicidal erythrocyte death. *Antioxid Redox Signal.* 21:138-153.
- Leiss, V., J. Illison, K. Domes, F. Hofmann, and R. Lukowski. 2014. Expression of cGMP-dependent protein kinase type I in mature white adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 452:151-156.
- Lindberg, P., D. Keeling, J. Fryklund, T. Andersson, P. Lundborg, and E. Carlsson. 2003. Review article: Esomeprazole--enhanced bio-availability, specificity for the proton pump and inhibition of acid secretion. *Aliment Pharmacol Ther.* 17:481-488.
- Livak, K.J., and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25:402-408.
- Lohmann, S.M., A.B. Vaandrager, A. Smolenski, U. Walter, and H.R. De Jonge. 1997. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci.* 22:307-312.
- Lohmann, S.M., U. Walter, P.E. Miller, P. Greengard, and P. De Camilli. 1981. Immunohistochemical localization of cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78:653-657.
- Lohr, M., and B. Keppler. 2005. Blutzellsystem und Hämostase in Innere Medizin Kompendium für Studium und Klinik. Elsevier, München. 118-139 pp.
- Luo, C., V. Gangadharan, K.K. Bali, R.G. Xie, N. Agarwal, M. Kurejova, A. Tappe-Theodor, I. Tegeder, S. Feil, G. Lewin, E. Polgar, A.J. Todd, J. Schlossmann, F. Hofmann, D.L. Liu, S.J. Hu, R. Feil, T. Kuner, and R. Kuner. 2012. Presynaptically localized cyclic GMP-dependent protein kinase 1 is a key determinant of spinal synaptic potentiation and pain hypersensitivity. *PLoS Biol.* 10:e1001283.
- Lutz, S.Z., A.M. Hennige, S. Feil, A. Peter, A. Gerling, J. Machann, S.M. Krober, M. Rath, A. Schurmann, C. Weigert, H.U. Haring, and R. Feil. 2011. Genetic ablation of cGMP-dependent protein kinase type I causes liver inflammation and fasting hyperglycemia. *Diabetes.* 60:1566-1576.
- Markert, T., A.B. Vaandrager, S. Gambaryan, D. Pohler, C. Hausler, U. Walter, H.R. De Jonge, T. Jarchau, and S.M. Lohmann. 1995. Endogenous expression of type II cGMP-dependent protein kinase mRNA and protein in rat intestine. Implications for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Clin Invest.* 96:822-830.
- Massberg, S., M. Sausbier, P. Klatt, M. Bauer, A. Pfeifer, W. Siess, R. Fassler, P. Ruth, F. Krombach, and F. Hofmann. 1999. Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I. *J Exp Med.* 189:1255-1264.
- McLean, E., M. Cogswell, I. Egli, D. Wojdyla, and B. de Benoist. 2009. Worldwide prevalence of anaemia, WHO Vitamin and Mineral Nutrition Information System, 1993-2005. *Public Health Nutr.* 12:444-454.
- Mullis, K.B., and F.A. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335-350.
- Nielsen, P. 2013. Eisen - Pharmakotherapie von Eisenmangel und Eisenüberladung in Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 11. Aufl., herausgegeben von Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F., Starke, K. Elsevier, Urban & Fischer, München. 711-720 pp.
- Oster, H., C. Werner, M.C. Magnone, H. Mayser, R. Feil, M.W. Seeliger, F. Hofmann, and U. Albrecht. 2003. cGMP-dependent protein kinase II modulates mPer1 and mPer2 gene induction and influences phase shifts of the circadian clock. *Curr Biol.* 13:725-733.
- Pantopoulos, K., S.K. Porwal, A. Tartakoff, and L. Devireddy. 2012. Mechanisms of mammalian iron homeostasis. *Biochemistry.* 51:5705-5724.

- Park, C.H., E.V. Valore, A.J. Waring, and T. Ganz. 2001. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem.* 276:7806-7810.
- Paul, C., F. Schoberl, P. Weinmeister, V. Micale, C.T. Wotjak, F. Hofmann, and T. Kleppisch. 2008. Signaling through cGMP-dependent protein kinase I in the amygdala is critical for auditory-cued fear memory and long-term potentiation. *J Neurosci.* 28:14202-14212.
- Pfeifer, A., A. Aszodi, U. Seidler, P. Ruth, F. Hofmann, and R. Fassler. 1996. Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II. *Science.* 274:2082-2086.
- Pfeifer, A., P. Klatt, S. Massberg, L. Ny, M. Sausbier, C. Hirneiss, G.X. Wang, M. Korth, A. Aszodi, K.E. Andersson, F. Krombach, A. Mayerhofer, P. Ruth, R. Fassler, and F. Hofmann. 1998. Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J.* 17:3045-3051.
- Pfeifer, A., P. Ruth, W. Dostmann, M. Sausbier, P. Klatt, and F. Hofmann. 1999. Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 135:105-149.
- Plante, L., G.M. Ferron, M. Unruh, and P.R. Mayer. 2004. Excretion of pantoprazole in human breast. *J Reprod Med.* 49:825-827.
- Pryzwansky, K.B., S. Kidao, T.A. Wyatt, W. Reed, and T.M. Lincoln. 1995. Localization of cyclic GMP-dependent protein kinase in human mononuclear phagocytes. *J Leukoc Biol.* 57:670-678.
- Qian, Y., D.S. Chao, D.R. Santillano, T.L. Cornwell, A.C. Nairn, P. Greengard, T.M. Lincoln, and D.S. Bredt. 1996. cGMP-dependent protein kinase in dorsal root ganglion: relationship with nitric oxide synthase and nociceptive neurons. *J Neurosci.* 16:3130-3138.
- Richter, G.W. 1978. The iron-loaded cell--the cytopathology of iron storage. A review. *Am J Pathol.* 91:362-404.
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239:487-491.
- Sauzeau, V., H. Le Jeune, C. Cario-Toumaniantz, A. Smolenski, S.M. Lohmann, J. Bertoglio, P. Chardin, P. Pacaud, and G. Loirand. 2000. Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem.* 275:21722-21729.
- Schlossmann, J., A. Ammendola, K. Ashman, X. Zong, A. Huber, G. Neubauer, G.X. Wang, H.D. Allescher, M. Korth, M. Wilm, F. Hofmann, and P. Ruth. 2000. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I β . *Nature.* 404:197-201.
- Silva, B., and P. Faustino. 2015. An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the associated pathologies. *Biochim Biophys Acta.* 1852:1347-1359.
- Singh, A.K., B. Spiessberger, W. Zheng, F. Xiao, R. Lukowski, J.W. Wegener, P. Weinmeister, D. Saur, S. Klein, M. Schemann, D. Krueger, U. Seidler, and F. Hofmann. 2012. Neuronal cGMP kinase I is essential for stimulation of duodenal bicarbonate secretion by luminal acid. *FASEB J.* 26:1745-1754.
- Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, and D.C. Klenk. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 150:76-85.
- Somlyo, A.P., and A.V. Somlyo. 2003. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev.* 83:1325-1358.
- Song, S.H., and A.C. Groom. 1972. Sequestration and possible maturation of reticulocytes in the normal spleen. *Can J Physiol Pharmacol.* 50:400-406.
- Surks, H.K., and M.E. Mendelsohn. 2003. Dimerization of cGMP-dependent protein kinase 1 α and the myosin-binding subunit of myosin phosphatase: role of leucine zipper domains. *Cell Signal.* 15:937-944.
- Surks, H.K., C.T. Richards, and M.E. Mendelsohn. 2003. Myosin phosphatase-Rho interacting protein. A new member of the myosin phosphatase complex that directly binds RhoA. *J Biol Chem.* 278:51484-51493.

- Sysmex. 2007. XT-2000iV-Fluoreszenz-Durchflusszytometrie in der Tierblutanalytik, http://www.sysmex.de/fileadmin/media/f101/Xtra/Themenblaetter/11.2.06_XT_VET_RZ_WEB.pdf.
- Tang, K.M., G.R. Wang, P. Lu, R.H. Karas, M. Aronovitz, S.P. Heximer, K.M. Kaltenbronn, K.J. Blumer, D.P. Siderovski, Y. Zhu, and M.E. Mendelsohn. 2003. Regulator of G-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure. *Nat Med.* 9:1506-1512.
- Vaandrager, A.B., A. Smolenski, B.C. Tilly, A.B. Houtsmuller, E.M. Ehlert, A.G. Bot, M. Edixhoven, W.E. Boomaars, S.M. Lohmann, and H.R. de Jonge. 1998. Membrane targeting of cGMP-dependent protein kinase is required for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:1466-1471.
- Wagner, C., A. Pfeifer, P. Ruth, F. Hofmann, and A. Kurtz. 1998. Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression. *J Clin Invest.* 102:1576-1582.
- Waldmann, R., S. Bauer, C. Gobel, F. Hofmann, K.H. Jakobs, and U. Walter. 1986. Demonstration of cGMP-dependent protein kinase and cGMP-dependent phosphorylation in cell-free extracts of platelets. *Eur J Biochem.* 158:203-210.
- Wang, J., D. Barbuskaite, M. Tozzi, A. Giannuzzo, C.E. Sorensen, and I. Novak. 2015. Proton Pump Inhibitors Inhibit Pancreatic Secretion: Role of Gastric and Non-Gastric H⁺/K⁺-ATPases. *PLoS One.* 10:e0126432.
- Weber, S., D. Bernhard, R. Lukowski, P. Weinmeister, R. Worner, J.W. Wegener, N. Valtcheva, S. Feil, J. Schlossmann, F. Hofmann, and R. Feil. 2007. Rescue of cGMP kinase I knockout mice by smooth muscle specific expression of either isozyme. *Circ Res.* 101:1096-1103.
- Wegener, J.W., H. Nawrath, W. Wolfsgruber, S. Kuhbandner, C. Werner, F. Hofmann, and R. Feil. 2002. cGMP-dependent protein kinase I mediates the negative inotropic effect of cGMP in the murine myocardium. *Circ Res.* 90:18-20.
- Werner, C.G., V. Godfrey, R.R. Arnold, G.L. Featherstone, D. Bender, J. Schlossmann, M. Schiemann, F. Hofmann, and K.B. Pryzwansky. 2005. Neutrophil dysfunction in guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase I-deficient mice. *J Immunol.* 175:1919-1929.
- Zhang, L., R. Lukowski, F. Gaertner, M. Lorenz, K.R. Legate, K. Domes, E. Angermeier, F. Hofmann, and S. Massberg. 2013. Thrombocytosis as a response to high interleukin-6 levels in cGMP-dependent protein kinase I mutant mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 33:1820-1828.

7. Anhang

7.1. Verwendete Primer

7.1.1. Primer für Genotypisierung

Mauslinie	Primer	Sequenz
cGKI KO	RF125	5' - GTC AAG TGA CCA CTA TG - 3'
	RF53	5' - CCT GGC TGT GAT TTC ACT CCA - 3'
	RF118	5' - AAA TTA TAA CTT GTC AAA TTC TTG - 3'
cGKI β -Rescue	RF67	5' - CTC AGA GTG GAA GGC CTG CTT - 3'
	SW8	5' - CGC AAG GGT TAC TCA CCA CA - 3'
	SW16	5' - CCT CCT TGA GCA TGA GAA TCT TG - 3'

7.1.2. Primer für qRT-PCR

m-RNA	Primer	Sequenz
HAMP	forward	5' - TGA GCA GCA CCA CCT ATC TC- 3'
	reverse	5' - ACA GCA GAA GAT GCA GAT GG- 3'
TFR1	forward	5' - TAC CTG GGC TAT TGT AAG CG- 3'
	reverse	5' - TTT GAG ATC CAG CCT CAC G- 3'
GAPDH	forward	5' - CGG CAA ATT CAA CGG CAC AGT CA- 3'
	reverse	5' - GGT TTC TCC AGG CGG CAC GTC A- 3'

7.2. Verwendete Antikörper

Primäre Antikörper			
Antikörper	Herkunft	Verwendung/ Verdünnung	Referenz
cGKIcommon; gereinigt	Kanninchen polyklonal	Western Blot 1:200	Institut für Pharmakologie und Toxikologie, TUM
FLC	Kanninchen	Western Blot 1:1000	Biotrend
GAPDH	Kanninchen polyklonal	Western Blot 1:5000	Sigma-Aldrich
Hämoglobin α	Kanninchen polyklonal	1:1000	Abcam
TER-119	Ratte biotinyliert monoklonal	immunomagnetische Zellisolation	R&D Systems

Sekundäre Antikörper			
Antikörper	Herkunft	Verwendung/ Verdünnung	Referenz
Anti-Kanninchen (Peroxidase-gekoppelt)	Ziege	1:50000	Dianova

8. Eigene Publikationen

Originalarbeiten

Zhang L., Lukowski R., Gaertner F., Lorenz M., Legate KR., Domes K., Angermeier E., Hofmann F., Massberg S. (2013). Thrombocytosis as a response to high interleukin-6 levels in cGMP-dependent protein kinase I mutant mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 33:1820-1828.

Angermeier E., Domes K., Lukowski R., Schlossmann J., Rathkolb B., Hrabě de Angelis M., Hofmann F. (2015). Iron deficiency anemia in cyclic GMP kinase knockout mice. *Haematologica* (accepted).

Abstracts

Zhang L., Lukowski R., Gaertner F., Lorenz M., Legate KR., Domes K., Angermeier E., Hofmann F., Massberg S. (2013). Anti-interleukin-6 therapy for treatment of high platelet counts in cGMP-dependent protein kinase I gene-targeted mice. *6th International Conference on cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications (Erfurt, Germany)*.

Angermeier E., Domes K., Hofmann F. (2015). Anemia of cGKI deficient mice is caused by intestinal bleeding. *7th International Conference on cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications (Trier, Germany)*.